

Pharmakologische Modulation des „oxidative burst“ aktivierter neutrophiler Granulozyten in Anwesenheit von anoxischen Kardiomyozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Susanne Szalay, geb. Holbe

aus Bad Nauheim

Giessen 1997

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung

Kerckhoff-Institut

Abteilung Experimentelle Kardiologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. Schaper

in Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Schaper

Gutachter: Prof. Dr. Teschemacher

Tag der Disputation: 04.05.1999

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| 1. Einleitung | 3 |
| 1.1. Die physiologische Aufgabe neutrophiler Granulozyten | 3 |
| 1.2. fMLP induziert den „oxidative burst“ der Neutrophilen | 4 |
| 1.3. Die ischämische Herzmuskelnekrose | 6 |
| 1.4. Die mögliche Rolle der polymorphkernigen Neutrophilen im sogenannten Reperfusionsschaden | 8 |
| 2. Fragestellung und Ziel der Arbeit | 11 |
| 3. Methoden | 13 |
| 3.1. Isolierung adulter Rattenkardiomyozyten | 13 |
| 3.1.1. Vorbereiten der Langendorff-Perfusionsapparatur | 13 |
| 3.1.2. Präparation und Perfusion des Herzens | 14 |
| 3.1.3. Zellfraktionierung und Kultivierung der Myozyten | 15 |
| 3.1.4. Anoxie der Myozyten unter In-vitro-Bedingungen | 15 |
| 3.2. PMN-Isolation | 16 |
| 3.3. Meßanordnung des In-vitro-Modells und Detektion freier Radikale | 16 |
| 3.4. Lichtmikroskopische Darstellung | 17 |
| 3.5. Statistische Auswertung | 18 |
| 4. Ergebnisse | 18 |
| 4.1. Ergebnisse der Biolumineszenzmessung | 18 |
| 4.1.1. Kinetik des „oxidative burst“ von fMLP aktivierten PMN | 19 |
| 4.1.2. Der „oxidative burst“ fMLP aktivierter Neutrophiler in Anwesenheit von normoxischen und anoxischen Myozyten | 22 |
| 4.1.3. Möglichkeiten der Modulation der Produktion freier Radikale aktivierter PMN | 25 |
| 4.1.3.1. Die Wirkung von Staurosporin auf fMLP aktivierte PMN | 27 |
| 4.1.3.2. Der Einfluß von sogenannten Radikalfängern auf den „respiratory burst“ | 28 |
| 4.1.3.2.1. Superoxid-Dismutase als Radikalfänger | 29 |
| 4.1.3.2.2. Verminderung der Radikaldetektion durch | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.1.3.3. Die Wirkung von Kalziumantagonisten auf den „oxidative burst“ | 32 |
| 4.1.3.4. Die Verminderung des „burst“ in Anwesenheit des β_1 -Agonisten Isoproterenol..... | 35 |
| 4.1.3.5. Der Einfluß von verschiedenen Adenosin-Agonisten und -Antagonisten auf den „burst“ aktivierter Neutrophiler..... | 36 |
| 4.2. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Beobachtung in der Co-Kultur... | 38 |
| 4.2.1. Radikal-“scavenger“ verbessern die Überlebenschancen von anoxischen Myozyten in der Co-Kultur mit aktivierten PMN... | 52 |
| 5. Diskussion..... | 58 |
| 5.1. Auswahl der Methoden..... | 58 |
| 5.2. Interpretation und Kritik der Ergebnisse..... | 61 |
| 5.3.Zusammenfassung..... | 66 |
| 6.Anhang..... | 67 |
| 6.1.Material..... | 67 |
| 6.1.1. Chemikalien und Material..... | 67 |
| 6.1.2. Lösungen und Puffer..... | 69 |
| 6.1.2.1. Lösungen und Puffer zur Myozyten-Isolation..... | 69 |
| 6.1.2.2. Lösungen und Puffer für die Isolation von Ratten-PMN..... | 72 |
| 6.1.2.3. Lösungen zur Biolumineszenzmessung..... | 72 |
| 6.1.2.4. Lösungen und Substanzen zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten..... | 72 |
| 6.1.2.5. Substanzen, die den „respiratory burst“ der Neutrophilen modulieren..... | 73 |
| 6.2. Literatur..... | 74 |
| 6.3. Abbildungsverzeichnis..... | 83 |

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:

Bedeutung:

| | |
|-------|---|
| AC | Adenylat Cyclase |
| AD | Adenosin-Deaminase |
| Amy | anoxische Myozyten |
| AP | Aminophyllin |
| BSA | Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin) |
| CPA | N6-Cyclopoentyladenosin |
| DMSO | Dimethylsufoxid |
| FMLP | N-formyl Met-Leu-Phe |
| GP | Glutathionperoxidase |
| HES | Hepes Earlsalz-Lösung |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure |
| HPO | Horseradish Peroxidase (Peroxidase vom Pferd) |
| IFKS | inaktiviertes fötales Kälberserum |
| K | Kontrolle |
| KAT | Katalase |
| KHM | Krebs-Henseleid-Medium |
| NADPH | Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form) |
| NECA | 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin |
| NMy | normoxische Myozyten |
| MPO | Myeloperoxidase |
| PBS | Phosphatpuffer |
| PIA | R(-) N6-(2-Phenylisopropyl)adenosin |
| PLC | Phospholipase C |
| PLD | Phospholipase D |
| PKC | Proteinkinase C |

Abkürzung:**Bedeutung:**

| | |
|--------|------------------------------|
| PMA | Phorbol-12Myristat-13-Azetat |
| PMN | polymorphkernige Neutrophile |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| Staur. | Staurosporin |
| TMZ | Trimetazidin |
| VER | Verapamil |
| Zym | Zymosan |

1. Einleitung

1.1. Die physiologische Aufgabe neutrophiler Granulozyten

Die polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) gehören zu den Leukozyten des Blutes und sind vor allem für die *unspezifische* Abwehr des Körpers zuständig. Die Leukozyten (weiße Blutzellen) unterteilt man in Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten, welche die *spezifischen* Immunreaktionen unterhalten), in Makrophagen (17-20 µm große phagozytosefähige Zellen mit bohnenförmigem Zellkern) und in Granulozyten. Letztere sind 10-12 µm groß und besitzen einen typischen segmentierten Kern. Je nach färberischem Verhalten ihrer intrazytoplasmatischen Granula trennt man die Granulozyten in drei morphologisch und funktionell verschiedenartige Typen auf, welche als neutrophile, eosinophile und basophile polymorphkernige Granulozyten bezeichnet werden. Die Neutrophilen stellen die unspezifische zelluläre Abwehr bei Entzündungsreaktionen dar. Die PMN sind in großer Anzahl ($4-8 \times 10^3/\mu\text{l}$) im Blut vorhanden und können bei Bedarf schnell aus dem Knochenmark mobilisiert und neuproduziert werden. Der neutrophile Granulozyt durchwandert während seines Lebens drei unterschiedliche Regionen bzw. Organsysteme im Körper: das Knochenmark (Bildungs- und Reifungsstätte der Granulozyten), das Blut (Transportorgan) und das Gewebe (wo die Granulozyten letztlich ihre Funktion erfüllen). Die neutrophilen Granulozyten sind fähig zur Phagozytose, zur Degranulation von proteolytischen Vesikeln und zur Produktion von Sauerstoffradikalen. Diese werden durch die aktivierte NADPH-Oxidase gebildet. Weil die Radikale rasch und in großer Menge produziert und abgebaut werden, bezeichnet man diesen Vorgang als „oxidative burst“ der Neutrophilen. Die reaktiven Sauerstoffprodukte erscheinen intrazellulär, wenn der neutrophile Granulozyt zu Verdauendes phagozytiert hat, andererseits können die Radikale auch nach außen hin abgegeben werden, etwa zur Schädigung größerer, nicht sofort phagozytierbarer Partikel oder Zellen. Die neutrophilen Granulozyten sind amöboid bewegliche Zellen, sie werden durch Botenstoffe zum Ort der Entzündung gelockt, können dann die Wände der Blutgefäße durch Diapedese durchdringen und sich ins Gewebe einnisten. Nach der Margination der Leukozyten an dem Gefäßendothelium, der Emigration in den Extravasalraum, der leukotaktisch gesteuerten Bewegung im Gewebe zu dem schädigenden Agens bzw. zum Entzündungsherd folgt die Aktivierung der PMN, der „oxidative burst“ und die Phagozytose. Die durchschnittliche Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten beträgt 3-4 Tage. Der PMN stirbt nach Aktivierung im Gewebe und nach Erschöpfung der Phagozytosefähigkeit (also nach Erfüllung seiner physiologischen Funktion) extravasal ab.

1.2. fMLP induziert den „oxidative burst“ der Neutrophilen

Verschiedene Substanzen wie z.B. opsonisierte Partikel (durch Immunglobuline besetzte und markierte Fremdkörper), Phorbol ester, Lezidine, Immunkomplexe, Kalzium-Ionophore, cis-ungesättigte Fettsäuren, hierbei insbesondere Arachidonsäurederivate etc. können über unterschiedliche Wirkungs-Mechanismen die polymorphkernigen Neutrophilen zur Produktion von Sauerstoffradikalen anregen (*Baggiolini et al. 1993*). In-vivo kommt es z.B. auch durch den Kontakt mit Bakterienoberflächen zum „oxidative burst“ der PMN, d.h. innerhalb kürzester Zeit zur massiven Erzeugung von reaktionsfähigen Sauerstoffprodukten. Im in-vitro-Experiment kann man sich entsprechend des Oligopeptids N-formyl Met-Leu-Phe (fMLP) bedienen, um eine Aktivierung der Neutrophilen zu erreichen. fMLP ist ein aus drei Aminosäuren bestehendes Peptid und wirkt über einen spezifischen fMLP-Rezeptor auf der PMN-Zelloberfläche (*Bengis-Garber et al. 1991*). Dem Rezeptor ist ein G-Protein nachgeschaltet, das zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) überleitet (*Smolen 1992*). fMLP ist in der Lage, alle drei Phospholipasen (PLA₂, PLC und PLD) zu aktivieren (*Cockcroft et al. 1992*). Über spezielle „second-messenger“-Wege kommt es schließlich zur Aktivierung der Proteinkinase C, der über einen noch unklaren Mechanismus die Aktivierung der NADPH-Oxidase folgt. Die Wirkungsweise von fMLP auf die PMN wird wie folgt in einem Schaubild (modifiziert nach *English 1992*) veranschaulicht:

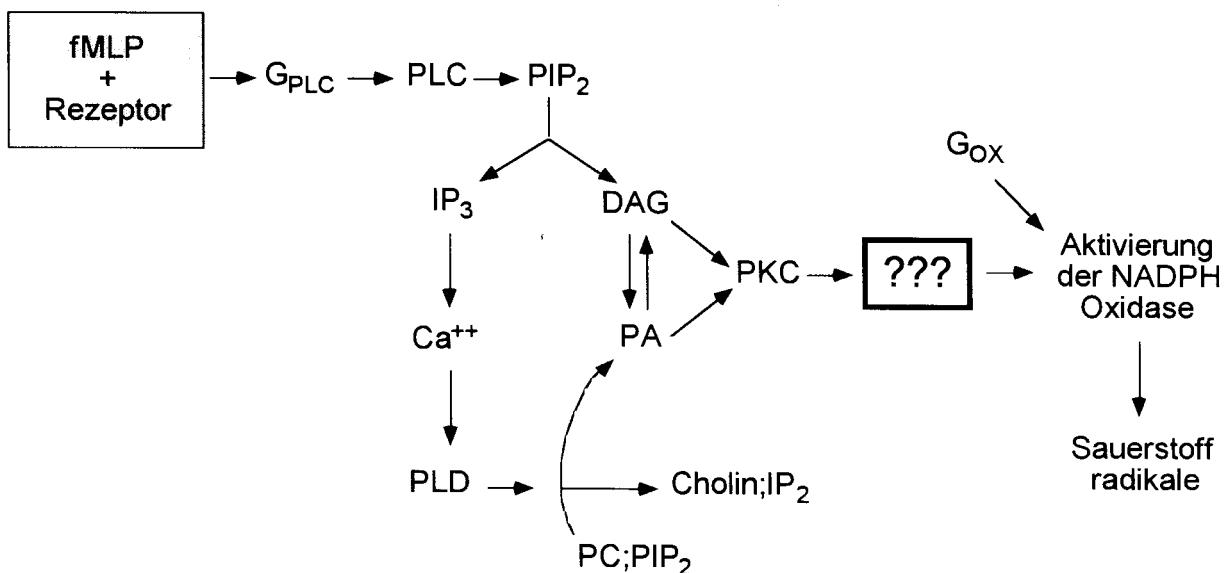


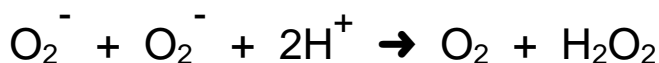
Abb. 1: Schema der Wirkungsweise von fMLP

PLC=Phospholipase C, PLD=Phospholipase D, G_{PLC}=G-Protein, das zur Aktivierung der PLC beiträgt, IP₃=Inositol-triphosphat, IP₂=Inositol-bisphosphat, PIP₂=Phosphatidylinositol 4.5 bisphosphat, DAG=Diacylglycerol, PA=Phosphatidsäure.

fMLP bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, dabei wird einerseits Kalzium von intrazellulären Kompartimenten mobilisiert andererseits der extrazelluläre Ca^{++} -Influx gesteigert. Die PLC und auch die NADPH-Oxidase sind kalziumabhängige Enzyme. Der Aktivierung der NADPH-Oxidase geht ein Aggregation des aus mehreren Teilen bestehenden Enzymkomplexes voraus. Die NADPH-Oxidase besteht aus membrangebundenen Komponenten, die Cytochrom b₅₅₈ und ein 45-kD Flavoprotein enthalten, und aus cytosolischen Bausteinen, welche als p47(phox), p67(phox) und GTP-bindendes Protein charakterisiert sind (*Clancy et al. 1992*). Während der Aktivierung muß dieser Multienzymkomplex zur funktionstüchtigen Einheit zusammengesetzt werden, um dann die Sauerstoffradikale zu erzeugen. Nach der Aggregation der NADPH-Oxidase folgt die Aktivierung derselben (*Dewald et al. 1979*). Die Folge ist, daß die Oxidoreduktase ein Elektron vom Donor NADPH zu einem Molekül Sauerstoff transferiert, und es entsteht zunächst ein Superoxid Anion (O_2^-), das durch sekundäre Prozesse in die reaktiven Sauerstoffradikale H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ und HOCl (letzteres durch die Myeloperoxidase) umgewandelt wird (*Clark et al. 1987*). Stoichiometrisch kann die Entstehung von Superoxid Anionen durch die Oxidase auf folgende Formel gebracht werden:



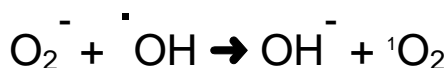
Durch sekundäre Prozesse entstehen andere Sauerstoffradikal-Produkte, welche z.T. noch reaktionsfähiger und aggressiver sind (*Steinbeck et al. 1992*): Hypochlorsäure (HOCl), „Singlet Oxygen“ ($^1\text{O}_2$), Hydrogenperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$). Die Bildung von H_2O_2 aus Superoxid Anionen entsteht spontan bei niedrigem pH oder vermittelt durch die Superoxid Dismutase (SOD). *Johnston* beschreibt diese Reaktion mit folgender Gleichung (*Johnston et al. 1975*):



Die Myeloperoxidase (MPO) führt zur Bildung von HOCl (Hypochlorsäure), und durch die Haber Weiss Reaktion werden Hydroxylradikale und OH^- gebildet:



Folgende weitere sekundäre Prozesse führen zur Bildung von „Singlet Oxygen“:



Die aktive NADPH-Oxidase ist ein membrangebundener Enzymkomplex, die entstehenden Sauerstoffradikale erscheinen entweder extrazellulär, wenn die Oxidase sich an der äußeren Zellmembran befindet, oder die Radikale werden in spezifische Vesikel abgegeben, wenn die NADPH-Oxidase in der Membran der intrazellulären Kompartimente eingebunden ist. Für gebildetes H_2O_2 stellen Membransysteme kein größeres Hindernis da, so daß in intrazellulären Kompartimenten gebildetes H_2O_2 in das Zytoplasma und weiter nach extrazellulär durch die Zellmembran diffundieren kann und umgekehrt. Im Zytoplasma des Phagozyten wird H_2O_2 durch die Katalase und Glutathionperoxidase (Oxidationsschutzmechanismen der Zelle) inaktiviert. Der „oxidative burst“ kann jeweils nur einmal an einem polymorphkernigen Neutrophilen beobachtet und gemessen werden. Ähnlich verhält es sich mit der Phagozytosefähigkeit dieser Zellen, denn sie ist nach kurzer Zeit erschöpft und der Granulozyt geht zugrunde.

1.3. Die ischämische Herzmuskelnekrose

Der ischämische Infarkt wird in der Regel durch einen Arterienverschluß verursacht und ist eine durch eine Durchblutungsstörung bedingte lokalisierte Nekrose eines Organteiles. Im Herzmuskel liegen besondere Verhältnisse vor, es gibt keine funktionell ausreichenden Anastomosen zwischen den Koronararterien, die bei Minderperfusion eine genügende Blutversorgung gewährleisten, weshalb man auch von „funktionellen Endarterien“ spricht. Durch den Gefäßverschluß kommt es zur Ischämie (Verminderung der Durchblutung infolge herabgesetzter Blutzufuhr) des nachfolgenden Gewebebezirks. Die Folgen der Ischämie für die betroffenen Zellen hängen allgemein von der Dauer der Ischämie, der jeweiligen Toleranz des Gewebes gegenüber Sauerstoffmangel und von der lokalen Gefäßarchitektur ab:

a) Dauer der Ischämie:

Ist die Ischämie von kurzer Dauer (weniger als 3 Minuten), erwartet man in der Regel keine Schäden. Eine längerdauernde Blutleere wird von den Geweben je nach Toleranz gegenüber ischämischen Bedingungen unterschiedlich vertragen.

b) Toleranz des Gewebes gegenüber Sauerstoffmangel:

Die primäre Toleranz der Gewebe gegenüber einem Sauerstoffmangel und/oder einer Minderperfusion ist um so geringer, je höher differenziert ein Gewebe ist. So weist das zentrale Nervensystem schon nach Ischämiezeiten von 4-6 Minuten irreversible Zellschädigungen auf. Dagegen vertragen parenchymatöse Organe eine Ischämie von einer halben bis zu einer Stunde, und Bindegewebe erweist sich als besonders widerstandsfähig. Sekundär hängt die Toleranz von der momentanen funktionellen Aktivität des Gewebes (oder der einzelnen Zellen) ab; so läßt sich z.B. die Toleranz gegenüber Ischämie durch Ruhigstellung oder Abkühlung erheblich erhöhen.

c) Die Gefäßarchitektur:

Durch das Fehlen einer doppelten Blutversorgung (wie es z.B. in der Lunge der Fall ist) und durch das Vorhandensein von „funktionelle Endarterien“ im Herzen kommt es beim Koronarverschluß zum ischämischen Infarkt. Allerdings kann sich bei den „funktionellen Endarterien“ (im Gegensatz zu anatomischen Endarterien) allmählich unter ganz bestimmten Vorraussetzungen (möglicherweise abhängig von gewissen Wachstumsfaktoren) eine Kollateralisierung ausbilden. Bei der Kollateralisierung kann es sich um eine echte Kapillarneubildung oder um eine Eröffnung vorhandener Gefäße handeln. Die Ausbildung von Kollateralen kann wahrscheinlich als eine Reaktion auf eine chronische Minderperfusion einzelner Koronarbezirke des Herzmuskels auftreten und wird durch ganz spezielle Faktoren gesteuert.

Im Gebiet distal des Gefäßverschlusses kommt es nach Unterbrechung der Blutzufuhr abhängig von der Dauer der Ischämie zu zunehmend schweren Gewebsschäden.

Durch rechtzeitige fibrinolytische Therapie kann die Ischämie beendet werden, das verschlossene Koronargefäß kann rekanalisiert und das Gewebe reperfundiert und oxygeniert werden.

Im postischämischen Herzmuskelgewebe unterscheidet man theoretisch zwischen reversibel und irreversibel geschädigten Myozyten. Im Optimalfall erholen sich erstere durch die rechtzeitig erfolgte Reperfusion, und der Nekrosebezirk beschränkt sich auf die irreversibel geschädigten Herzmuskelzellen.

Wie sehr nun die einzelne Herzmuskelzelle tatsächlich durch die Ischämie geschädigt ist, wird zunächst schwer zu entscheiden sein. Die normale funktionell aktive Zelle, die an Störgrößen adaptierte Zelle, die geschädigte Zelle und die tote Zelle stellen nur unscharf abzugrenzende Stadien in einer kontinuierlichen Reihe von funktionellen und strukturellen Veränderungen und Zuständen dar. Entsprechend gibt es zunächst wenige Anhaltspunkte zur Unterscheidung zwischen einer reversibel geschädigten, zur Regeneration fähigen, und einer irreversibel geschädigten, im Untergang befindlichen Zelle. Einige ultrastrukturelle Kriterien (z.B. die Veränderungen der Mitochondrien mit Veränderungen der Granula zu sog. „flocculent densities“ als Zeichen der irreversiblen Schädigung) können helfen, den Übergangsbereich zwischen reversibler und irreversibler Schädigung der Myozyten genauer zu definieren (*J. Schaper 1984*).

Die Gewebsischämie hat eine Umstellung des Zellstoffwechsels auf die anaerobe Glykolyse zur Folge. Die Energieausbeute ist nun vergleichsweise minimal, so daß die energieabhängigen Systeme (z.B. die Ionenpumpen und die kontraktilen Elemente des Zellskeletts und der Muskelzellen insbesondere) ihre Funktion verlieren. Es kommt zu einer Azidose (H^+ -Ionen akkumulieren, der PH-Wert verschiebt sich zu niedrigeren Werten), Hyperosmolarität, intrazellulären Kalziumüberladung, was zu einer Hyperkontraktion der Zellen führt. Die kalziumbedingte Hyperkontraktion verstärkt in-vivo die Myokardnekrose durch Gewebszerreißung (*Siegmund et al. 1990*). Weiterhin werden durch die Ischämie eine Abfolge von Reaktionen eingeleitet wie u.a. die Freisetzung von inflammatorischen Mediatorstoffen, Obstruktion der Kapillaren durch die Granulozyten und die Formation von Sauerstoffradikalen.

Dauert die Ischämie an, entwickelt sich ein Nekrosebezirk, neutrophile Granulozyten werden chemotaktisch angelockt, sie wandern ins geschädigte Herzmuskelgewebe ein und erfüllen ihre Funktion in der Beseitigung der nekrotischen Zellen. Parallel zu dieser ablaufenden Entzündungsreaktion mit Beseitigung der Nekrose beginnt eine Reparaturphase mit Bildung von kollagenen Fasern, Fibroblastenvermehrung bis hin zur Entwicklung eines Narbenbezirkes.

1.4. Die mögliche Rolle der polymorphkernigen Neutrophilen im Reperfusionsschaden

Reperfusion ist die einzige Möglichkeit beim Infarkt „langfristig“ das Gewebe vor der Nekrotisierung zu retten. Durch Auflösung des Gefäßverschlusses mit fibrinolytischen Maßnahmen erreicht man eine Reperfusion („Reflow“) des der Ischämie ausgesetzten Gewebebereiches. Im Optimalfall wird dadurch das Myokard rechtzeitig wieder mit Sauerstoff versorgt, und die Herzmuskelzellen erholen sich von der kurzzeitigen Ischämie vollständig. Sehr gut sind die Aussichten auf Regeneration, wenn das ischämische Areal durch Reperfusion innerhalb der ersten 2 Stunden wieder durchblutet wird. Durch die Reperfusion werden Zellprodukte, die sich während des Gefäßverschlusses im azidotischen Milieu anhäufen konnten (z.B. Adenosin und Laktat), ausgewaschen. Die Reperfusion des ischämischen Herzmuskelbereiches hat u.a. die Reoxygenation, Substratzufuhr, Normalisierung des Gewebs-PH und der Osmolarität zur Folge. Zum anderen gelangen beim „Reflow“ mit dem Blutstrom zellige Blutkomponenten in den der Ischämie ausgesetzten Myokardbezirk. Die Leukozyten, speziell die neutrophilen Granulozyten erfüllen dann ihre physiologische Funktion, indem sie nach Emigration, nekrotische Zellen oder durch die Ischämie (irreversibel) beschädigte Zellen mittels Phagozytose abräumen. Bei der Diskussion um den Reperfusionsschaden mißt man u.a. den neutrophilen Granulozyten und den von ihnen gebildeten Sauerstoffradikalen eine entscheidende Bedeutung bei (*Sawa 1990, Siminiak et al. 1993*).

Die Theorie des Reperfusionsschadens postuliert, daß bei der Reperfusion „Faktoren“ in das der Ischämie ausgesetzte Gewebe eingebracht werden, welche durch die Ischämie geschädigte Myokardzellen zusätzlich schädigen, so daß diese Zellen nicht mehr zur Regeneration fähig wären. Der Reperfusionsschaden wäre also als eine Addition von schädlichen Einwirkungen während der Ischämiezeit und während der Reperfusion zu verstehen, d.h. besonders im Grenzbereich zwischen reversibel geschädigten Zellen (daraus folgt: Gewebserholung) und irreversibel geschädigten Myozyten (daraus folgt: Ischämieschaden) würde der Reperfusionsschaden zusätzlich zu den Bedingungen der Ischämie das Ausmaß der Zellschädigung mitbestimmen.

Die Ursache der vermuteten zusätzlichen Zellschädigung durch Reperfusion ist noch unklar. Einige Autoren (*Engler 1989 und Henry et al. 1990*) sehen in den aktivierten PMN und in den gebildeten Radikalen einen zusätzlich schädigenden Faktor für das postischämische Gewebe. Durch Reperfusion könnte das Ausmaß des Zelluntergangs zugunsten des Zelltods oder vermehrten Untergangs von Gewebe entschieden und so dem Erfolg der rechtzeitig einsetzenden fibrinolytischen Therapie entgegengewirkt werden (*Ward 1991, Mullane 1991*). Durch die Reperfusion, insbesondere durch das Einbringen von Granulozyten und durch das Entstehen von Sauerstoffradikalen im ischämischen Gewebe treten möglicherweise schädigende Faktoren zu den für die Regeneration des Gewebes vorteilhaften Effekte der Reperfusion hinzu. Der Reperfusionsschaden führt wahrscheinlich unter anderem zu folgenden Phänomenen: Generation von Sauerstoffradikalen, Verlust der antioxidativen Enzymsysteme, durch neutrophile Granulozyten bedingte Gewebsschädigung und -dysfunktion, Kalziumschwankungen, Verlust des energieliefernden ATP in den Herzmuskelzellen, „myokardiales stunning“, Zellödem und reperfusionbedingte Arrhythmien (*Opie 1993, und Ferrari et al. 1993, 1995*).

Einige pharmakologische Agentien kamen bereits zum Einsatz, die spezifische anti-inflammatorische Effekte im ischämischen Myokardium demonstrieren konnten: Steroide, welche die Freisetzung von Arachidonsäure verhindern, Iloprost, ein Prostacyclin-Analogon, welches Granulozyten zu inhibieren vermag, Ibuprofen, ein Cyclooxygenase-Blocker, der ebenfalls die PMN inhibiert, N-2-Mercapto-propionyl-glycerin, ein intracellulärer Radikalfänger und BW 755C, eine Lipoxxygenase, Cyclooxygenase-blockierende Substanz mit Radikalfängerwirkung (*Opie 1989*). Der gemeinsame Ansatz dieser Studien ist, daß Substanzen, die freie Radikale abfangen und die inflammatorische Reaktion der Granulozyten beschränken, somit auch das Ausmaß der möglicherweise additiv zellschädigenden Effekte durch den Reperfusionsschaden schmälern könnten.

Sauerstoffradikale können in unterschiedlichen zellulären Stoffwechselwegen entstehen (siehe unten) und die Zelle besitzt sogenannte Radikalfängersysteme (Oxidationsschutz), um die gebildeten Radikale abzufangen, damit es nicht zu einer Zellschädigung kommt. Die drei wichtigsten ubiquitär vorkommenden Oxidationsschutzmechanismen der Zellen sind:

- **Glutathion-Peroxidase:** H_2O_2 wird durch reduziertes Glutathion entfernt, das aus oxidiertem Glutathion durch Reduktion mit NADPH bereitgestellt wird.

Reaktionsschema: $2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \geq \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$

- **Katalase:** Die Katalasereaktion hat ebenfalls die Umwandlung von H_2O_2 zur Folge, wie es das folgende Schema zeigt

Reaktionsschema: $2 \text{ H}_2\text{O}_2 \geq 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{O}_2$

- **Superoxid-Dismutase:** Dieses Enzym dient zur Entfernung von O_2^- , dem reaktiven Superoxidradikalanion. Es entsteht bei der enzymatischen Reduktion von O_2 in verschiedenen Reaktionen.

Reaktionsschema: $2 \text{ O}_2^- + 2\text{H}^+ \geq \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

Neben diesen zellulären Schutzmechanismen gegenüber gebildeten Sauerstoffradikalen durch gewisse Enzymsysteme spielen noch nicht-enzymatische Substanzen mit Radikalfängerwirkung eine wichtige Rolle. Zu dieser Gruppe der nicht-enzymatischen „Scavengers“ zählen u.a. wichtige Vitamine. So üben z.B. α -Tocopherol (Vitamin E), β -Carotin, Vitamin A und Ascorbinsäure wichtige antioxidative Schutzfunktionen aus indem sie die gebildeten Sauerstoffradikale eliminieren können.

Sauerstoffradikale können allgemein folgenden biologischen Reaktionen entstammen (*Flaherty 1991*):

1. Xanthin-Oxidase Reaktion beim Abbau der Purinnukleotide (vermehrte Sauerstoffradikal-produktion z.B. bei ischämischen Endothelzellen der Ratte)
2. reduzierte Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatase-Oxidase Reaktion (Radikalgeneration während des „oxidative burst“ der aktivierten Granulozyten)
3. Monoaminoxidase Reaktion (Katecholaminoxidation durch MAO)
4. Ubiquinon-Cytochrom C - Reaktion (Elektronentransport durch die Enzyme der Atmungskette in den Mitochondrien)
5. Cytochrom P450 Reaktionen (z.B. die Biotransformation am glatten endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen)
6. Cyclo-oxygenase Reaktion (Arachidonsäureoxidation)

Die freien Radikale der aktivierten PMN und die inflammatorischen Reaktionen der Granulozyten sind nach *Engler* ein wichtiger Mechanismus des Reperfusionsschadens (*Engler 1989*). Der Reperfusionsschaden könnte also durch die Unterdrückung der inflammatorischen Reaktionen der aktivierten PMN während und nach Thrombolyse auf ein Minimum reduziert werden. Würde es gelingen, den Reperfusionsschaden zu begrenzen, wäre ein wichtiger Schritt in der Soforttherapie des Herzinfarktes durch die Optimierung der fibrinolytischen Therapie vollzogen.

In der Arbeit über die Wechselwirkungen von aktivierten PMN und anoxischen Myozyten in-vitro zeigt *Z. Szalay*, daß es in Anwesenheit von anoxischen Myozyten im Assay mit aktivierten PMN zu einer höheren Detektion von Sauerstoffradikalen während des „oxidative burst“ der Neutrophilen kommt (*Z. Szalay 1997*). Diese Steigerung des „oxidative burst“ führt *Z. Szalay* auf den Verlust der zellulären Radikalfängersysteme durch die Anoxie der Myozyten und auf wahrscheinlich zusätzlich veränderte Oberflächenstrukturen der anoxischen Zellen zurück.

So werden die Neutrophilen zu einer höheren Radikalproduktion angeregt, und diese massive Steigerung des „oxidative burst“ tritt auch ungebrems in Erscheinung dadurch, daß die zellulären Puffersysteme der anoxischen Myozyten ausfallen, welche die Sauerstoffradikale abfangen könnten. Z. Szalay demonstriert weiterhin, daß die anoxischen Myozyten die Co-Inkubation von aktivierten PMN in der Zellkultur schlechter überstehen als die normoxischen Herzmuskelzellen, die durch ihr intaktes Radikalfängersystem durch die Sauerstoffradikale weniger attackiert werden (Z. Szalay, 1997). Nimmt man an, daß PMN im postischämischen Areal nach Einwanderung aktiviert werden und durch eine massive Freisetzung ihrer Sauerstoffradikale, die durch Ischämie vorgeschädigten Myozyten zusätzlich beschädigen (die Toleranz der Zellen gegenüber den gebildeten Sauerstoffradikalen ist durch den Verlust von Radikalfängersystemen herabgesetzt, entstandene Radikale können dadurch nicht abgefangen werden und verursachen eine fortschreitende Zellschädigung), so liegt der Gedanke nahe, durch Reduktion der Radikalgeneration aktivierter PMN oder durch Abfangen schon gebildeter Radikale durch geeignete Puffersysteme die schädigende Wirkung der Sauerstoffradikale aktivierter PMN eindämmen zu können.

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, durch verschiedene Pharmaka den in Anwesenheit von anoxischen Kardiomyozyten gesteigerten „oxidative burst“ von fMLP aktivierten PMN zu reduzieren. Weiterhin soll der Effekt der eingesetzten Substanzen in der Co-Kultur von Myozyten mit aktivierten Neutrophilen geprüft werden.

Fragestellungen der Arbeit lauten:

Läßt sich der „oxidative burst“ der fMLP aktivierten PMN durch bestimmte Pharmaka im Chemilumineszenzassay mit anoxischen Kardiomyozyten beeinflussen ?

Welche Pharmaka sind ggf. in der Lage, die Radikalproduktion der aktivierten PMN zu reduzieren; vermögen sie dies auch im Assay von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Kardiomyozyten ?

Beeinflußt, eine geringere Sauerstoffradikalproduktion die Überlebensdauer der anoxischen Myozyten in Anwesenheit von PMN ?

3. Methoden

3.1. Isolierung adulter Rattenkardiomyozyten

Bei der Isolierung der Rattenkardiomyozyten wird auf etablierte Methoden, beschrieben von *Piper 1990*, zurückgegriffen und diese gegebenenfalls modifiziert, wie in der Abhandlung von *Z. Szalay 1997* beschrieben.

3.1.1. Vorbereiten der Langendorff-Perfusionsapparatur

Die Langendorff-Perfusionsapparatur dient zur Isolierung der Myozyten aus Myokardgewebe. Das entnommene Herz wird hierbei einem System angeschlossen, welches eine gleichmäßige Perfusion der Koronarien mit proteolytischer Lösung (Kollagenase) sichert, so daß es zu einer langsamen Auflösung der interzellulären Verbindungen des Herzmuskelgewebes kommt. Das Langendorff-System ist eine Anordnung, die man in zwei ineinander umwandelbare Funktionsstellungen bringen kann. Zum einen bedient man sich dem sogenannten *nicht* - rezirkulierenden, zum anderen dem rezirkulierenden-System zur Isolierung der Myozyten. Ein rezirkulierendes System erhält man, wenn man die Position des kleineren Behälter B (siehe Abbildung 2) so verändert, daß er sich direkt unter dem perfundierten Rattenherzen befindet. Die Schalterpositionen sind entsprechend gewählt, so daß ein geschlossener Kreislauf der Kollagenaselösung im Langendorff-System ermöglicht wird.

Zur Vorbereitung der Apparatur wird das Langendorff-System von dem großen Behälter an bis zur Perfusionsnadel, an der später das Herz hängen wird, blasenfrei mit KHM (Krebs-Henseleid-Medium) gefüllt. Die Kollagenaselösung wird in das kleinere Gefäß A gefiltert und beide Behälter mit steril gefiltertem Carbogen begast. Ein Durchlauferwärmer sichert eine gleichmäßige Erwärmung der Lösung in der Perfusionsapparatur auf 37 Grad Celsius.

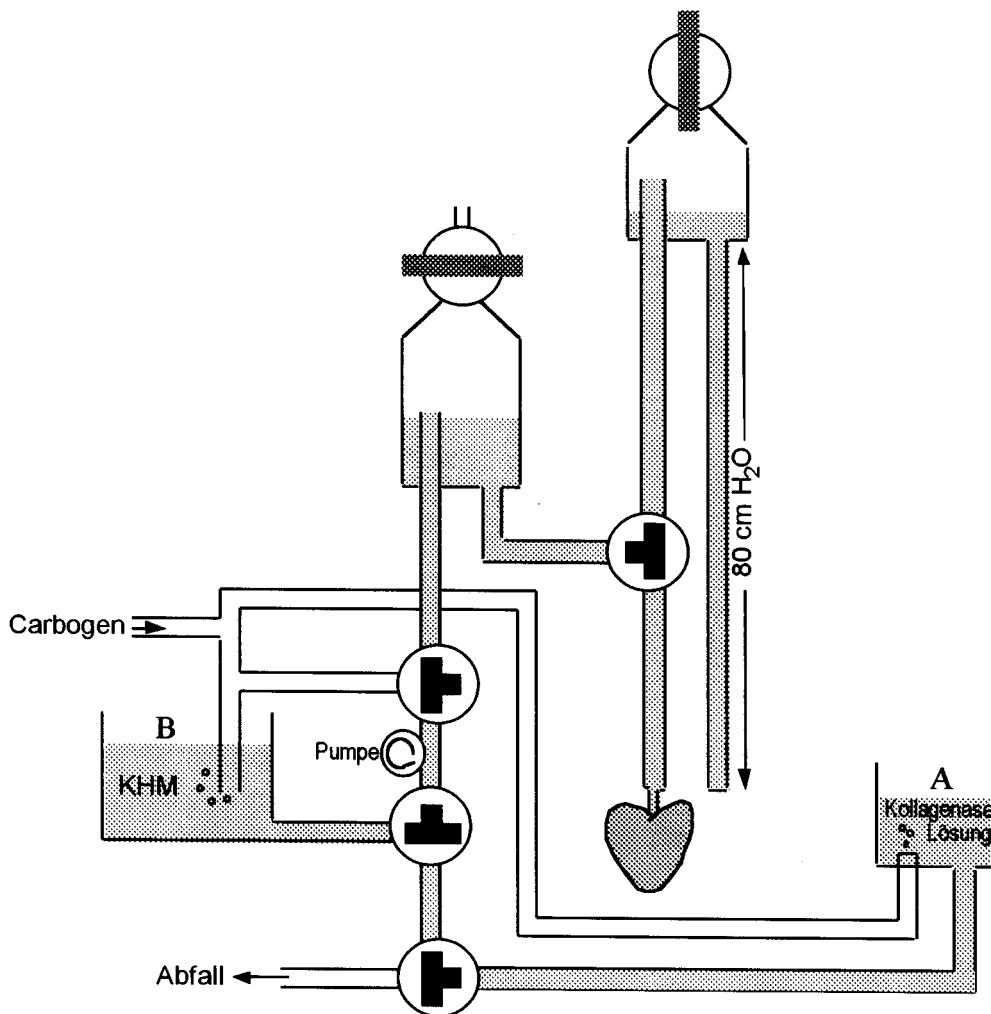


Abb. 2: Langendorff-Perfusionsapparatur

3.1.2. Präparation und Perfusion des Herzens

Die Anästhesie einer 150 g schweren Ratte erfolgt durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital, in 0.9% NaCl versehen mit 5000 IE/ml Heparin. Nach Desinfektion mit 70% Ethanol und Präparation der Haut erfolgt die mediale Sternotomie des Thorax. Das entnommene Herz wird an der freipräparierten Aorta an der Kanüle des Langendorff-Systems angebracht, so daß beide Koronarostien perfundiert werden können. Durch 5minütige Perfusion mit KHM werden beide Koronararterien blutleer und es folgt weiterhin eine Perfusion mit Kollagenaselösung für 20 bis 25 Minuten in einem rezirkulierenden (geschlossenen) System. Der Fluß wird so reguliert, daß ein konstanter Perfusionsdruck von 80 cm

H₂O (58.8 mmHg) erreicht wird. Während der Kollagenasezirkulation beginnen sich die Interzellular-Verbindungen zu lockern, eine Folge davon ist, daß der Perfusionsdruck abfällt. Zur Gegenregulation muß nun mit zunehmender Kollagenasewirkung die Fließgeschwindigkeit angepaßt und gesteigert werden. Nach Beenden der Perfusionszeit werden die Atrien und großen Gefäße abgetrennt und das Herz in 10 ml KHM mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Diese Suspension wird in dem kleinen Behälter A für 5-7 Minuten retrograd mit Carbogen begast und durchmischt, um eine vollständige Gewebedissoziation zu erreichen. Anschließendes Filtern durch ein Nylonnetz mit 200 µm Maschenweite hält größere Gewebestücke zurück.

3.1.3. Zellfraktionierung und Kultivierung der Myozyten

Der gefilterten Zellsuspension setzt man 10 ml KHM zu und zentrifugiert sie bei 480 Umdrehungen pro Minute (rpm) 4 Minuten lang, um im Sediment die Kardiomyozyten zu erhalten. Das Sediment resuspendiert man in Percoll-18 und schichtet dies auf 10 ml Percoll-M zur Trennung von intakten Myozyten und von Zelltrümmern. Die intakten („rod shaped“) Myozyten werden nach 15minütiger Zentrifugation bei 480 rpm als Sediment sichtbar. Anschließend wäscht man die isolierten Herzmuskelzellen mit HES (Hepes Earsalz-Lösung) und dann ein zweites Mal mit Medium 199 durch Zentrifugation bei 480 rpm für 5 Minuten. Die Myozyten werden in einer Neubauerzählkammer gezählt und auf die mit Laminin beschichteten Kulturschalen ausgesät. Das Kulturmedium ist zunächst Medium 199 mit 4% FKS (inaktiviertes fötales Kälberserum), das man nach 2h durch serumfreies Medium 199 ersetzt. Die Zelldichte einer 78 cm² großen Kulturschale beträgt 0.5×10^6 Zellen in 10 ml Medium.

3.1.4. Anoxie der Myozyten unter in-vitro-Bedingungen

Die Anoxie wird unter in-vitro-Bedingungen durch Verwendung des Gas-Pack-Plus-Systems von Becton und Dickinson erreicht. Die isolierten Kardiomyozyten werden in Medium 199 zwölf Stunden lang der Anoxie ausgesetzt. Als Kontrollpopulation dient eine Kulturschale mit normoxischen Myozyten, die während dieser Zeit im Brutschrank unter für die Zellkultur optimalen atmosphärischen Bedingungen aufbewahrt werden. Das Medium, welches für die Anoxie der Myozyten verwendet wird, entspricht dem der Kontrollmyozyten unter normoxischen Bedingungen.

3.2. PMN-Isolation

Nach Anästhesie einer 250 g schweren Ratte mit Pentobarbital und Hautdesinfektion erfolgt die mediale Sternotomie zur Eröffnung des Thorax. Das Perikard wird inzidiert und der linke Ventrikel punktiert, um langsam das Blut zu aspirieren. In der verwendeten Spritze (20 ml) werden vorher 3 ml Heparin (in 1.5 M NaCl gelöst) aufgezogen. Die Punktionsnadel wird relativ großlumig gewählt (ca. 1.4 mm). Nachdem das Blut 15 Minuten bei 1 400 rpm zentrifugiert wurde, resuspendiert man die zelligen Blutbestandteile im Sediment in dem 2fachen Volumen 2%ige Gelatine enthaltenden Hanks-Puffer und setzt dem noch etwa 0.5 ml Heparin zur Antikoagulation hinzu. Nach einer Stunde Sedimentation bei 37 Grad Celsius erhält man die Leukozyten im Überstand, diesen zentrifugiert man 10 Minuten bei 1 600 rpm und die Leukozytenfraktion erscheint als Sediment. Die Leukozyten, gelöst in 2 ml Hanks-Puffer, werden auf den vorbereiteten Percoll-Dichtegradienten gelegt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 3 000 rpm erhält man die 90% reine PMN-Fraktion in den unteren zwei Banden im aufgeschichteten Dichtegradienten. Um die Percoll-Lösung auszuwaschen, löst man die PMN in 10 ml Hanks-Puffer und zentrifugiert 5 Minuten lang bei 1 500 rpm. Die PMN werden in der Neubauer-zählkammer gezählt und mit Hanks-Puffer so verdünnt, daß man eine Konzentration von 500 000 PMN pro 100 µl Puffer erhält.

3.3. Meßanordnung des in-vitro-Modells und Detektion freier Radikale

Die neutrophilen Granulozyten werden im in-vitro-Modell durch fMLP aktiviert, und die Produktion von freien Radikalen wird durch Biolumineszenzmessung im Auto Lumat LB 953 gemessen. Luminol dient dabei als Lumineszenzverstärker und ist in der Lage, die Lichtausbeute um mehr als das 1 000fache zu verstärken (*Woodhead 1984* und *Hantke 1986*). Ein Photomultiplier mißt die Lichtemission in cps (= gezählte Photonen pro Sekunde), die der Produktion der Sauerstoffradikale entspricht, welche wiederum die Aktivität der NADPH-Oxidase der PMN widerspiegelt. Luminol wird in Anwesenheit von H_2O_2 zu einer instabilen Verbindung (Aminophthalat) oxidiert, bei deren Übergang zu einem energetisch stabileren Zustand ein Lichtphoton emittiert (*Allen 1975*). Diese gebildeten Photonen werden durch die Biolumineszenzmessung detektiert und mittels eines gekoppelten PC-Rechners graphisch dargestellt. Der PC-Rechner ist mit geeigneter Software ausgestattet, welche verschiedene Protokolltypen zur Analyse der Proben anbietet. Der Protokolltyp „Kinetics“ ist für kinetische Messungen der geeignete Protokolltyp und erlaubt eine genaue kinetische Analyse eines kurzen Zeitintervalles. Die Proben werden nacheinander vollständig ausgemessen, und eine Kinetikkurve mit hundert Datenpunkten erstellt. Durch zwei Injektoren kann das in Meßposition befindliche

Meßröhrchen mit je 100 µl einer Lösung beschickt werden, und die Messung beginnt sofort nach der Injektion. Einer der Injektoren wird zur Förderung von PMN benutzt, so daß gewährleistet ist, daß die Reaktion mit Beginn der Messung startet. Im Meßröhrchen vorgelegt sind fMLP (N-formyl Met-Leu-Phe), Natriumazid und 10 U HPO (Meerettich-peroxidase), die Proben werden mittels Injektor mit PMN beschickt und für Luminol (Verstärkersubstanz) steht der zweite Injektor zur Verfügung. Ein Meßprotokoll sieht dann folgendermaßen aus:

| Substanz | Volumen und Endkonzentration in 1 ml Puffer |
|---------------------|--|
| Hanks-Puffer | 400 µl (bis auf 1ml Probenvolumen auffüllen) |
| fMLP | 100 µl (1 µM), d.h. 0.1µM Endkonzentration |
| HPO | 10 U in 100 µl PBS |
| Natriumazid | 100 µl 1mM Natriumazid, d.h. 0.1 mM Endkonzentration |
| Myozyten | 100 µl mit 50 000 Myozyten |
| PMN (Injektor1) | 100 µl mit 500 000 PMN |
| Luminol (Injektor2) | 100 µl 0.1 mM, d.h. 0.01 mM Endkonzentration |

Natriumazid und die Peroxidase sichern die schnelle Detektion der gebildeten H₂O₂-Radikale im Assay mit fMLP-aktivierten PMN. Während des Meßvorganges sind die Zellen (sowohl die Neutrophilen, als auch die Myozyten) in Hanks-Puffer gehalten. Die Verwendung von Medium 199 in der Probe eignet sich aus verschiedenen Gründen nicht für die Biolumineszenzmessung (*Cronstein et al. 1986, Elferink 1992, und Z. Szalay 1997*). Durch den Gehalt an Adenosin, welches den „oxidative burst“ der PMN via Adenosin-Rezeptoren unterdrücken kann, ist das Signal der H₂O₂-Bildung bei Aktivierung der NADPH-Oxidase kaum zu detektieren. Weiterhin können Substanzen wie Vitamine oder Nukleotid-Abkömmlinge die Aufzeichnung des „oxidative burst“ unmöglich machen, so daß die Biolumineszenzmessung in Hanks-Puffer vorgenommen wird. Die Anzahl der Neutrophilen ist mit 500 000 PMN pro Probe konstant. Myozyten werden im Verhältnis 1:10 zugesetzt, d.h. 50 000 Myozyten pro Meßröhrchen.

3.4. Lichtmikroskopische Darstellung

Die Zellkultur der Myozyten wird mittels Lichtmikroskopie betrachtet. Die lichtmikroskopischen Abbildungen sind mit Vergrößerungen von 50- bis 250fach aufgenommen. Es sind Nativpräparate ohne Färbung. Mit einer Vergrößerung von 100- bis 150fach sind die PMN in der Kokultur gut erkennbar. Einige Abbildungen (Abb. 17 a, b, c, d, Abb. 18 und 19) entstehen durch Ausschnittsvergrößerungen im Photolabor.

3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mittels des Statistikprogramms „Solo“ für Windows vorgenommen. Die Summe der Einzelsignale während einer Messung (das Integral unter der Kinetikkurve) ergibt den Ausgangswert, angegeben in cps (counts per second). Dieser Wert wird in Beziehung gesetzt zur Kontrollmessung und in Prozent angegeben, dabei wird die Referenzprobe gleich 100% gesetzt. Die Referenzprobe ist in den durchgeführten Versuchen jeweils: fMLP aktivierte PMN und anoxische Myozyten. „n“ bedeutet die Anzahl der durchgeführten Einzelmessungen, „Mean“ der Durchschnittswert der Messungen angegeben in Prozent zur Referenzmessung (fMLP aktivierte PMN). Die Ergebnisse werden mittels T-test analysiert und die Standardabweichung als „Standard Error“ und „Stand. Error of Mean“ angegeben. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu prüfen werden noch Equal-Variance-Test und Aspin Welch-Test als weiterführende Tests durchgeführt; hierbei ist $p < 0,05$ als signifikant, $p < 0,001$ als hochsignifikant anzusehen.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Biolumineszenzmessung

4.1.1. Kinetik des „oxidative burst“ von fMLP-aktivierten PMN

fMLP ist ein starker Aktivator der NADPH-Oxidase. Die erzeugten Sauerstoffradikale der aktivierten PMN, insbesondere H_2O_2 , diffundieren leicht durch biologische Membranen und werden mittels Luminol als Lichtsignal detektierbar. Der „oxidative burst“ der durch fMLP aktivierte PMN hat eine charakteristische Kinetik. Die Aktivierung der Oxidase durch fMLP geschieht innerhalb von einigen Sekunden und hat nach 20-40 Sekunden bereits den Maximalwert erreicht. Ist der Maximalwert erreicht, überwiegt der Abbau der freien Sauerstoffradikale der Produktion und die Kurve fällt ab, bis sie sich wieder dem Ausgangswert annähert. Eine typische Kinetikkurve von durch fMLP aktivierten PMN wird in der folgenden Abbildung dargestellt:

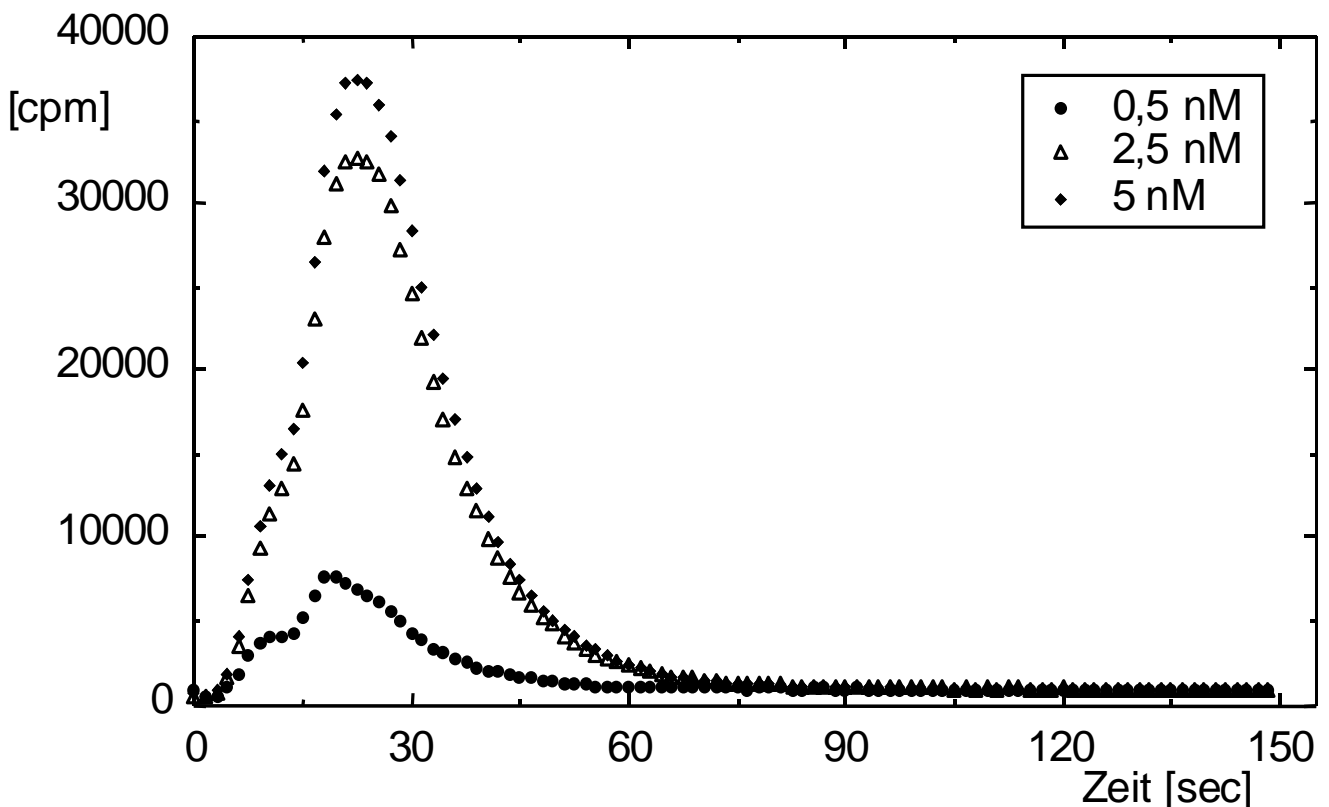


Abb. 3:Kinetikgraph: 500 000 PMN durch fMLP aktiviert

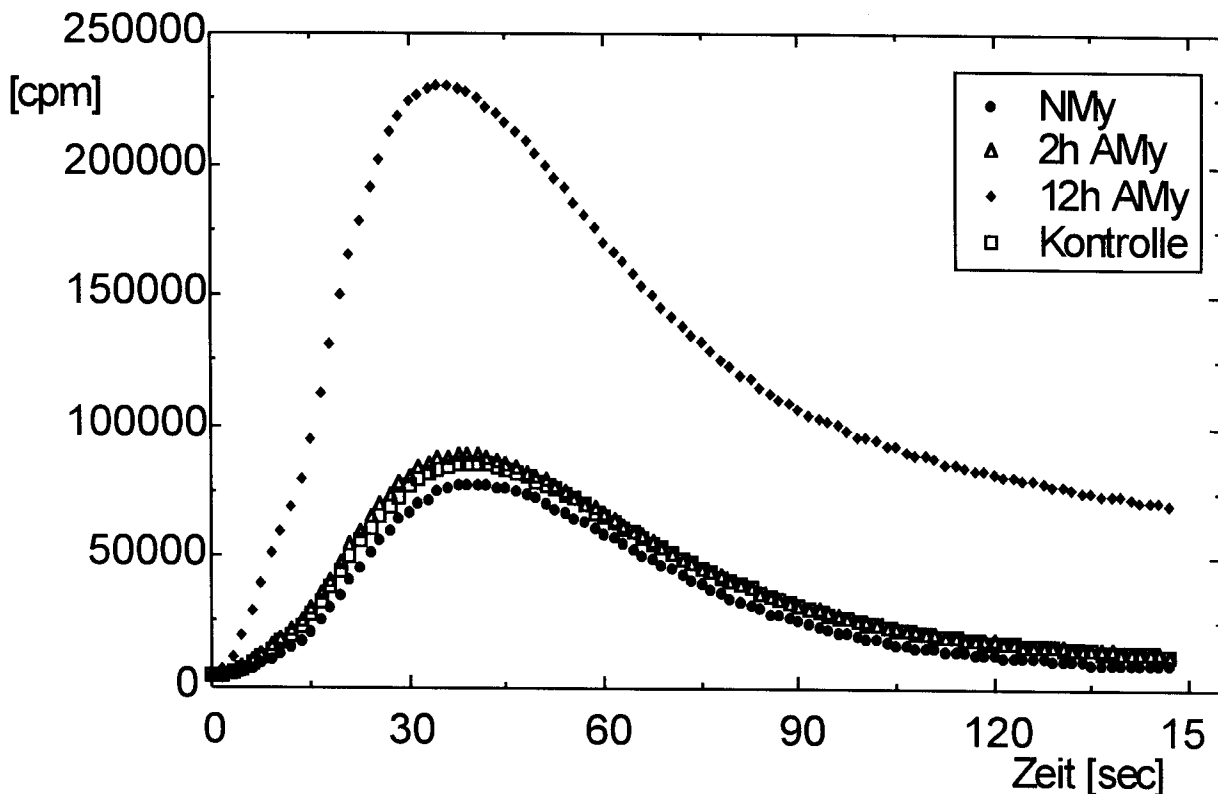
Auf der x-Achse eines Kinetikgraphen (wie in Abbildung 3) wird die Zeit, und auf der y-Achse die gebildeten H_2O_2 -Radikale, detektiert als Lichtblitze im Luminol vermittelten Biolumineszenzassay, aufgetragen. Die Ausbeute der Lichtblitze steigert sich bei fMLP aktivierten PMN rasch zu einem Maximum, das innerhalb von 20 bis 40 Sekunden erreicht wird. Nach dieser maximalen Aktivierung der NADPH-Oxidase fällt das Signal wieder ab, um sich nach 120 bis 180 Sekunden dem Ausgangswert anzunähern. Diese relativ schnell ablaufende Kinetik der freien Radikalbildung aktivierter PMN wird auch als „oxidative burst“ bezeichnet und entspricht der Erzeugung und dem Abbau von reaktiven Sauerstoffprodukten innerhalb kürzester Zeit (hier: bei fMLP als Aktivator 180 Sekunden). In der vorgehenden Abbildung läßt sich auch eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachten, d.h. durch höhere Konzentrationen des Stimulus (fMLP) läßt sich die Radikalausbeute im Biolumineszenzassay entsprechend steigern. Die Konzentration von fMLP in den fliegenden Messprotokollen ist mit $0,1 \mu\text{M}$ festgelegt.

4.1.2. Der „oxidative burst“ fMLP aktivierter Neutrophiler in Anwesenheit von normoxischen und anoxischen Myozyten

Dem Biolumineszenzassay mit fMLP aktivierten Neutrophilen werden Myozyten zugegeben und die Ausbeute an produzierten Sauerstoffradikalen als Kinetikgraph aufgezeichnet. Das Verhältnis von aktivierten neutrophilen Granulozyten zu Myozyten ist mit 500 000 PMN : 50 000 Myozyten konstant mit 10 : 1 festgelegt. Vergleicht man die Kinetikgraphen und die Integrale der Kurven miteinander, so läßt sich deutlich feststellen, daß normoxische Herzmuskelzellen im Assay die freie Radikaldetektion reduzieren, während anoxische Myozyten den „burst“ zu steigern vermögen (jeweils im Vergleich zu der Reaktion von stimulierten PMN allein). Um die Beziehung zwischen Radikalausbeute und Anoxiedauer zu verdeutlichen, wurde eine Messung mit 2h anoxischen Myozyten durchgeführt.

Mit Beginn des Biolumineszenzassays werden die polymorphkernigen Neutrophilen durch $0,1 \mu\text{M}$ fMLP zur Produktion von Sauerstoffradikalen angeregt. Die Radikalproduktion kann in Anwesenheit von anoxischen Myozyten gesteigert werden, die Anwesenheit von normoxischen Kardiomyozyten bewirkt eine Dämpfung der Signals.

Die Kontrollkurve von neutrophilen Granulozyten, welche durch fMLP aktiviert werden, kann durch die Anwesenheit von anoxischen und normoxischen Myozyten in der Probe modifiziert werden (*Z. Szalay 1997*).



500000 PMN stimuliert mit fMLP, 50000 Myozyten

Kinetikgraphik mit Zusatz von normoxischen (NMy), 2h und 12h anoxischen Myozyten (AMy) zum fMLP-Assay mit PMN nach Z. Szalay

Abb. 4: Kinetikgraphik mit Zusatz von normoxischen (NMy), 2h und 12h anoxischen Myozyten (AMy) zum fMLP-Assay mit PMN (Z. Szalay1997)

Der Vergleich der kinetischen Messungen macht deutlich, daß die Ausbeute der freien Radikalproduktion aktivierter PMN mit der Anoxiedauer der Myozyten im Assay korreliert. So führen zwölf Stunden anoxische Myozyten (12h AMy) in der Biolumineszenzmessung mit aktivierten PMN zur höchsten Sauerstoffradikalausbeute. Die Kurve der 2h anoxischen Myozyten liegt über dem Kontrollwert (aktivierte PMN ohne Myozyten), wobei normoxische Myozyten (NMy) das Kontrollsignal sogar zu reduzieren vermögen (Pufferwirkung normoxischer Myozyten). In einer zusammenfassenden Statistik, gewonnen durch Vergleich der Integrale der jeweiligen Kinetikgraphen, ergibt sich das in Abbildung 5 folgende Bild.

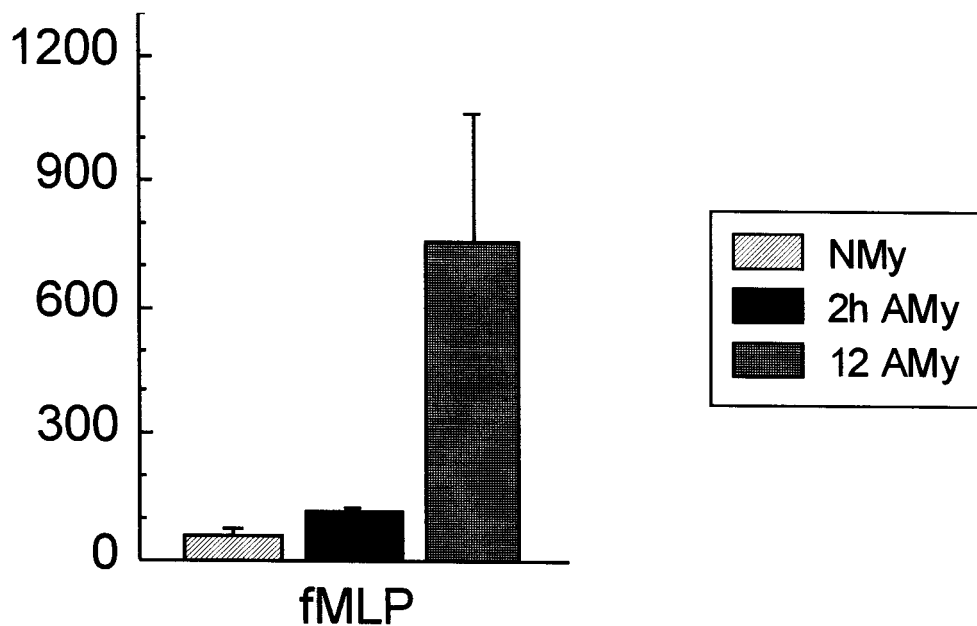


Abb. 5 a: Zusammenfassung der Effekte von normoxischen (NMy), 2h und 12h anoxischen Myozyten (AMy) zum fMLP-Assay, in einem Histogramm dargestellt (Z. Szalay 1997)

| Nr. | Bezeichnung | Durchschnitt (Mean) | Stand. Fehler (Stand. Error) | Vergleich | Signifikanz (Equal-Variance) | Signifikanz (Aspin Welch) | n | Stand. Error of Mean |
|-----|-------------|---------------------|------------------------------|-----------|------------------------------|---------------------------|----|----------------------|
| 1 | NMy | 52,5 | 5,0 | 1-3<>0 | p=0,001 | P=0,007 | 45 | 0,75 |
| 2 | 2hAMy | 117,2 | 8,8 | 1-2<>0 | p<0,001 | P<0,001 | 8 | 3,11 |
| 3 | 12h AMy | 413,8 | 24,8 | 2-3<>0 | p=0,014 | P<0,001 | 33 | 4,3 |

Abb. 5 b: Statistische Auswertung der Ergebnisse mit normoxischen (NMy), 2h anoxischen (2hAMY) und 12 h anoxischen Myozyten (12hAMY). Der Referenzwert ist das Signal fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (100%). Welche Gruppen verglichen werden, ist in der Spalte „Vergleich“ angegeben, die Angaben beziehen sich auf die Numerierung in der ersten Spalte.

Die Bildung freier Radikale wird in Anwesenheit von normoxischen Myozyten (NMy) im Vergleich zur Kontrolle (100%) um 52% vermindert. Dagegen erhöht sich das Signal in Anwesenheit von 2h anoxischen Myozyten (2h AMy) um 17%, und in Anwesenheit von 12h anoxischen Myozyten (12h AMy) steigt die Radikalbildung weiter auf 413%. Die durch fMLP aktivierten PMN reagieren also insbesondere auf 12h anoxische Herzmuskelzellen mit einer Steigerung der Sauerstoffradikalbildung auf das 4fache im Vergleich zum Kontrollwert. Als Kontrolle (100%) dient hierbei die Ausbeute von H_2O_2 , wenn PMN allein durch fMLP angeregt werden (es befinden sich keine Myozyten im Kontroll-Assay).

4.1.3. Möglichkeiten der Modulation der Produktion freier Radikale aktivierter PMN

Verschiedene Substanzen sind in der Lage, den „oxidative burst“ aktivierter neutrophiler Granulozyten zu modulieren. Die eingesetzten Pharmaka bedienen sich dabei unterschiedlichster Angriffspunkte, um letztlich die NADPH-Oxidase-Aktivität zu bremsen oder die gebildeten Radikale als „scavenger“ (Radikalfänger) abzufangen. Im Biolumineszenzassay kann die Wirkung der eingesetzten Substanzen an einer Abflachung des Kinetikgraphen bzw. einem kleineren Kurvenintegral, was gleichbedeutend ist mit einer verringerten Radikalproduktion der PMN (oder im Falle der Radikalfänger: verminderter Radikaldetektion im Assay wegen der Pufferwirkung der eingesetzten Substanzen), beobachtet werden. Die hierbei verwendeten Stoffe können fünf unterschiedlichen pharmakologischen Gruppen zugeordnet werden: 1) Proteinkinase C - Inhibitoren: Staurosporin

2) Radikalfänger: SOD (Superoxid Dismutase), Katalase und Glutathionperoxidase

3) Kalziumantagonisten: Verapamil und TMZ bzw.

Trimetazidin mit anti-ischämischen Eigenschaften

4) β_1 -Rezeptoren Agonisten: Isoproterenol

5) Adenosin-Agonisten: Adenosin, NECA, PIA und CPA

Alle im Folgenden getesteten Substanzen haben einen Einfluß auf fMLP aktivierte Neutrophile, so daß es zu einem deutlich reduzierten „oxidative burst“ und zu einer Verminderung des Biolumineszenzsignals während der Messung kommt. Dies ist im Detail im nächsten Abschnitt (4.1.3.1.) an der Wirkung von Staurosporin dargestellt.

Danach werden die verschiedenen Pharmaka eingesetzt, um den massiv gesteigerten „burst“ der PMN in Anwesenheit von 12h anoxischen Myozyten zu reduzieren: Es befinden sich fMLP aktivierte PMN und 12h anoxische Myozyten neben der Testsubstanz in der Probe. Die Wirkstoffe beeinflussen den „oxidative burst“ der PMN, jedoch ist ein zweiter Effekt während der Messung, nämlich auf die Myozyten nicht auszuschließen, was an anderer Stelle noch zu diskutieren ist.

4.1.3.1. Die Wirkung von Staurosporin auf fMLP-aktivierte PMN

Staurosporin ist ein unspezifischer Proteinkinase C Inhibitor (*Santosh 1992*) und somit in der Lage, an einem zentralen Punkt die Aktivierung der Neutrophilen zu bremsen (siehe Abbildung 1). Setzt man Staurosporin dem Assay von fMLP-aktivierten PMN hinzu, so läßt sich dosisabhängig der „oxidative burst“ unterdrücken. Abbildung 11 demonstriert den Einfluß von Staurosporin (verwendet in den Konzentrationen: 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} M) auf die Kinetik des fMLP ($0.1\mu\text{M}$) induzierten „burst“ der neutrophilen Granulozyten. Bei dem Vergleich der einzelnen Kinetikkurven fällt eine dosisabhängige Reduktion des Signals auf. Die Fläche unter der Kurve (d.h. das Integral) entspricht den insgesamt gebildeten Sauerstoffradikalen während des Zeitintervalles. Unter dem Einfluß von Staurosporin nimmt somit die Summe der gebildeten Radikale dosisabhängig ab.

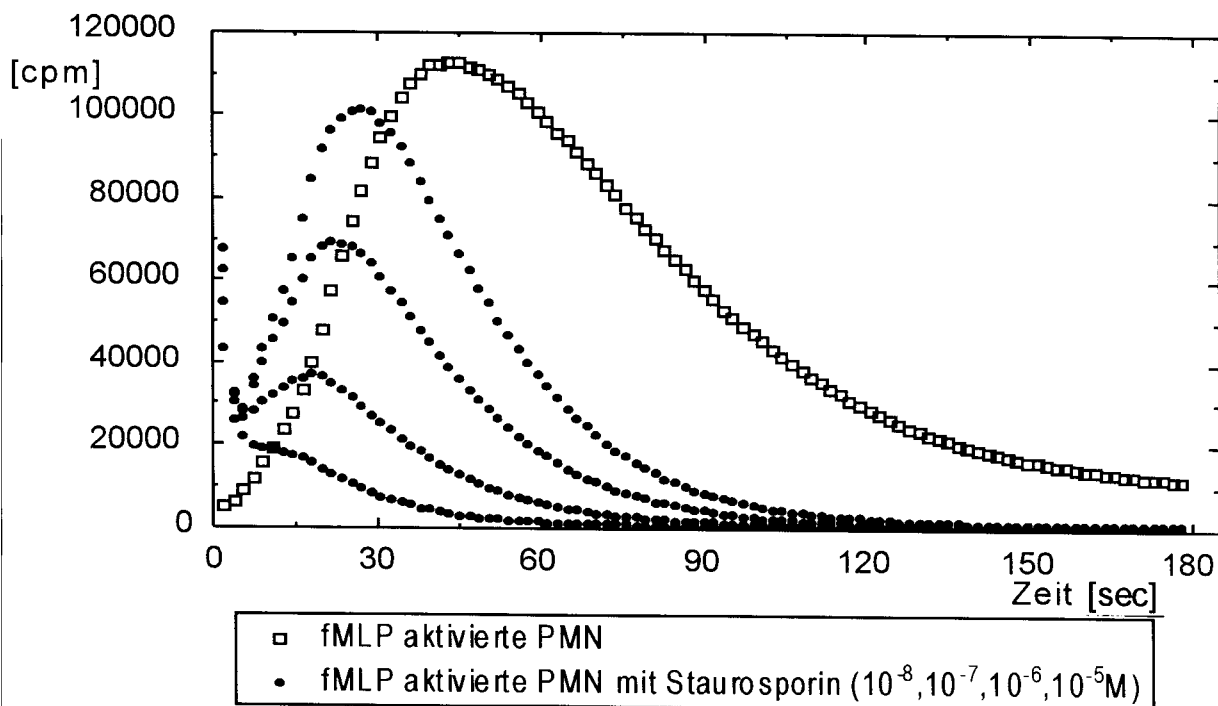


Abb. 6: Der „respiratory burst“ von fMLP aktivierten PMN unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von Staurosporin

Staurosporin (10^{-7} M) ist auch in der Lage den massiv gesteigerten „oxidative burst“ fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (12h anoxische Myozyten) zu vermindern, was in der folgenden Abbildung dargestellt ist. Bei diesem Histogramm ist die Summe der detektierten Lichtsignale (welche in den kinetischen Darstellungen dem Integral unter der Kurve entsprechen) vergleichend dargestellt.

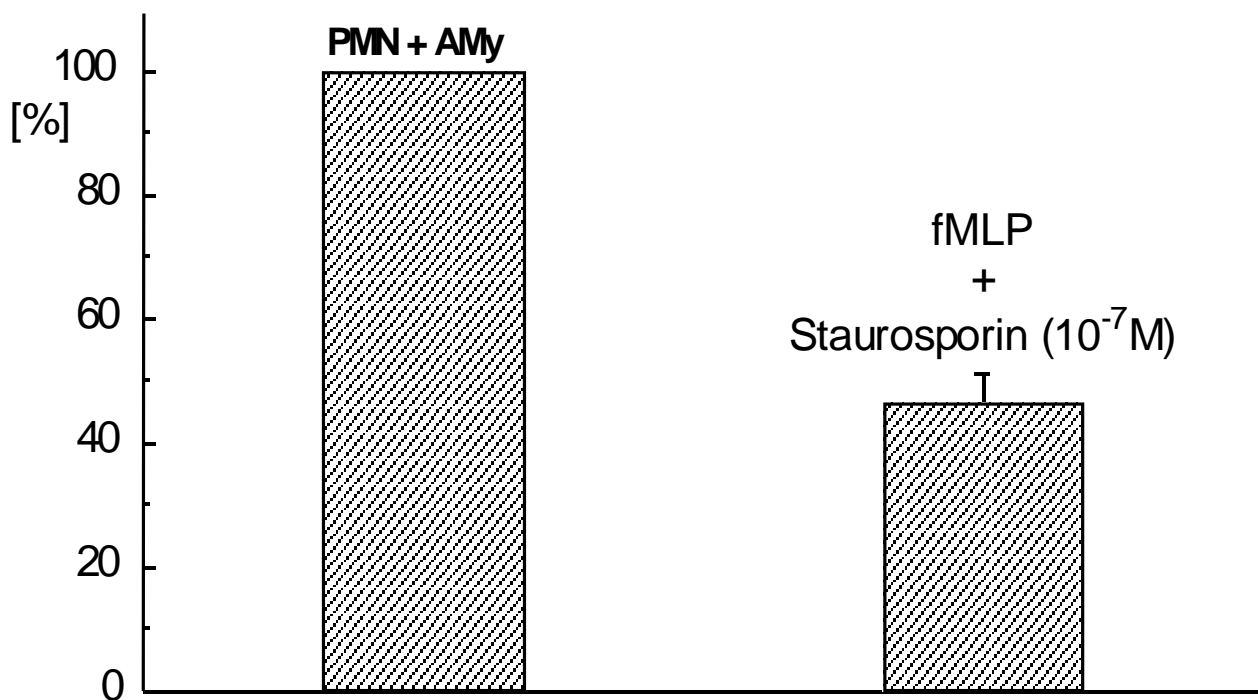


Abb. 7 a: Vergleich der Biolumineszenzassays fMLP aktivierter PMN und 12h anoxischer Myozyten bei Zusatz von Staurosporin

| Nr. | Bezeichnung | Mean | Stand. Error | Vergleich | Equal-Variance | Aspin Welch | n | Stand. Error of Mean |
|-----|------------------------|-------|--------------|-----------|----------------|-------------|----|----------------------|
| 1 | 12h Ay | 194,3 | 15,8 | | | | 13 | 4,38 |
| 2 | 12h AMy + Staurosporin | 46,7 | 4,1 | 1-2 < > 0 | p<0,001 | p<0,001 | 8 | 1,44 |

Abb. 7 b: Vergleich von 12h anoxischen Myozyten (12hAMy) und 12h anoxischen Myozyten und Staurosporin im Assay mit fMLP aktivierten PMN (Referenzwert: fMLP aktivierte PMN mit anoxischen Myozyten, entspricht 100%)

Als Kontrollwert dient in Abbildung 7 a das Signal von fMLP (0.1 µM) aktivierten PMN in Anwesenheit von 12h anoxischen Myozyten. Staurosporin ist in der Lage, in einer Konzentration von 10⁻⁷ im Assay mit fMLP aktivierten PMN den „oxidative burst“, die insgesamt gebildeten Sauerstoffradikale auf 47% zu senken.

4.1.3.2. Der Einfluß von sogenannten Radikalfängern auf den „respiratory burst“

Radikal-„scavenger“ sind in der Lage, die von aktivierten Neutrophilen gebildeten Sauerstoffradikale abzufangen. Sie beeinflussen die Aktivität der NADPH-Oxidase nicht direkt, sondern entfernen die gebildeten Radikale, indem sie eine chemische Verbindung mit den Sauerstoffprodukten eingehen. Bevor die reaktiven Sauerstoffprodukte der aktivierten PMN im Assay detektiert werden können, werden sie bei Zusatz von sogenannten „scavengern“ abgefangen und so der Radikalmessung im Autolumat entzogen. Zu den so wirkenden Radikalfängern zählen die Superoxid-Dismutase (SOD), die Katalase (KAT) und die Glutathionperoxidase (GP). Die folgende zusammenfassende Statistik zeigt, inwieweit die Radikal-„scavenger“ in der Lage sind, den massiven „burst“ der fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten zu reduzieren. Als Referenzwert (K=100%) ist die Radikalproduktion fMLP aktivierter PMN in Gegenwart von 12h anoxischen Herzmuskelzellen im Histiogramm dargestellt.

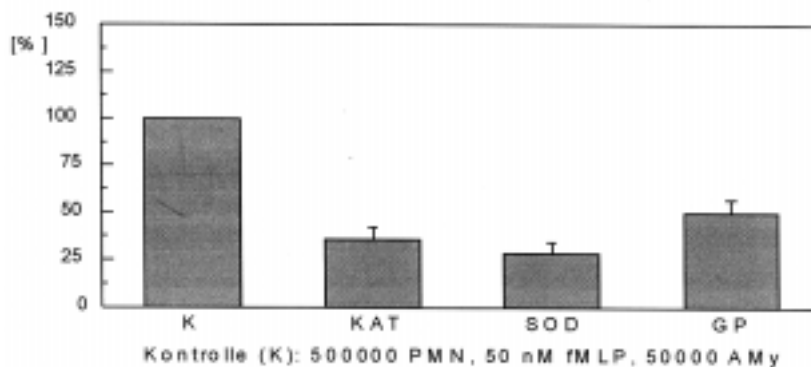


Abb. 8 a: Vergleich von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (Kontrollwert) und Zusatz von Katalase, SOD und GP

| Nr. | Bezeichnung | Mean | Stand. Error | Vergleich | Equal-Variance | Aspin Welch | n | Stand. Error of Mean |
|-----|-------------|-------|--------------|-----------|----------------|-------------|----|----------------------|
| 1 | 12h AM | 194,3 | 15,8 | | | | 13 | 4,38 |
| 2 | ..+ SOD | 28,7 | 5,6 | 1-2<>0 | p<0,001 | p<0,001 | 10 | 1,77 |
| 3 | ..+ CAT | 35,8 | 6,1 | 1-3<>0 | p<0,001 | p<0,001 | 10 | 1,9 |
| 4 | ..+ GP | 47,5 | 6,3 | 1-4<>0 | p<0,001 | p<0,001 | 7 | 2,38 |

Abb. 8 b: Statistischer Vergleich von fMLP aktivierten PMN, 12h anoxischen Myozyten und den jeweiligen Pharmaka: Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GP), der Referenzwert (100%) ist hierbei das Signal von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten

4.1.3.2.1. Superoxid-Dismutase als Radikalfänger

Die Superoxid-Dismutase ist ein starker Radikalfänger. Wie schon in der zusammenfassenden Statistik in 4.1.3.2. erkennbar, kann SOD den „oxidative burst“ um etwa 70% im Vergleich zum Kontrollwert senken. Der folgende Kinetikgraph in Abbildung 9 veranschaulicht noch einmal exemplarisch die Fähigkeit von SOD, als Radikalfänger den „oxidative burst“ zu vermindern. Dosisabhängig (Konzentrationen von 5, 10 und 50 U werden in dem Assay verwandt) gelingt es durch SOD, die Sauerstoffradikalproduktion der fMLP aktivierten Neutrophilen in Anwesenheit von 12h anoxischen Myozyten zu senken.

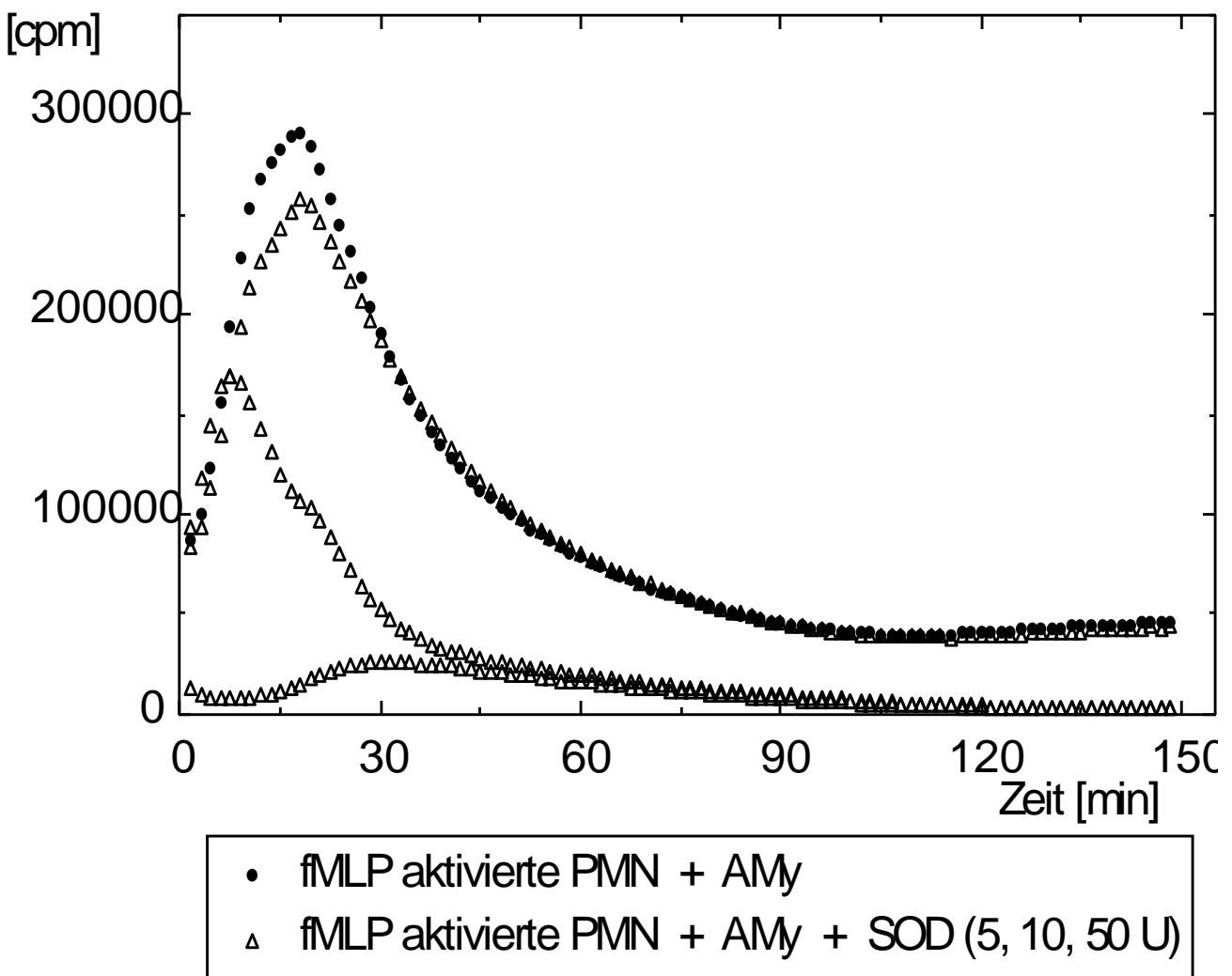


Abb. 9: Kinetik des „oxidative burst“ fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (AMy) und Zusatz von SOD zum Assay

4.1.3.2.2. Verminderung der Radikaldetektion durch Katalase

Die folgende Kinetik, dargestellt in Abbildung 10, ist ein Beispiel, wie der Radikalfänger Katalase in der Lage ist, den „respiratory burst“ von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten zu senken. In dem Diagramm ist die Wirkung von 5, 10 und 50 U Katalase zum Assay mit anoxischen Myozyten und aktivierten PMN exemplarisch dargestellt.

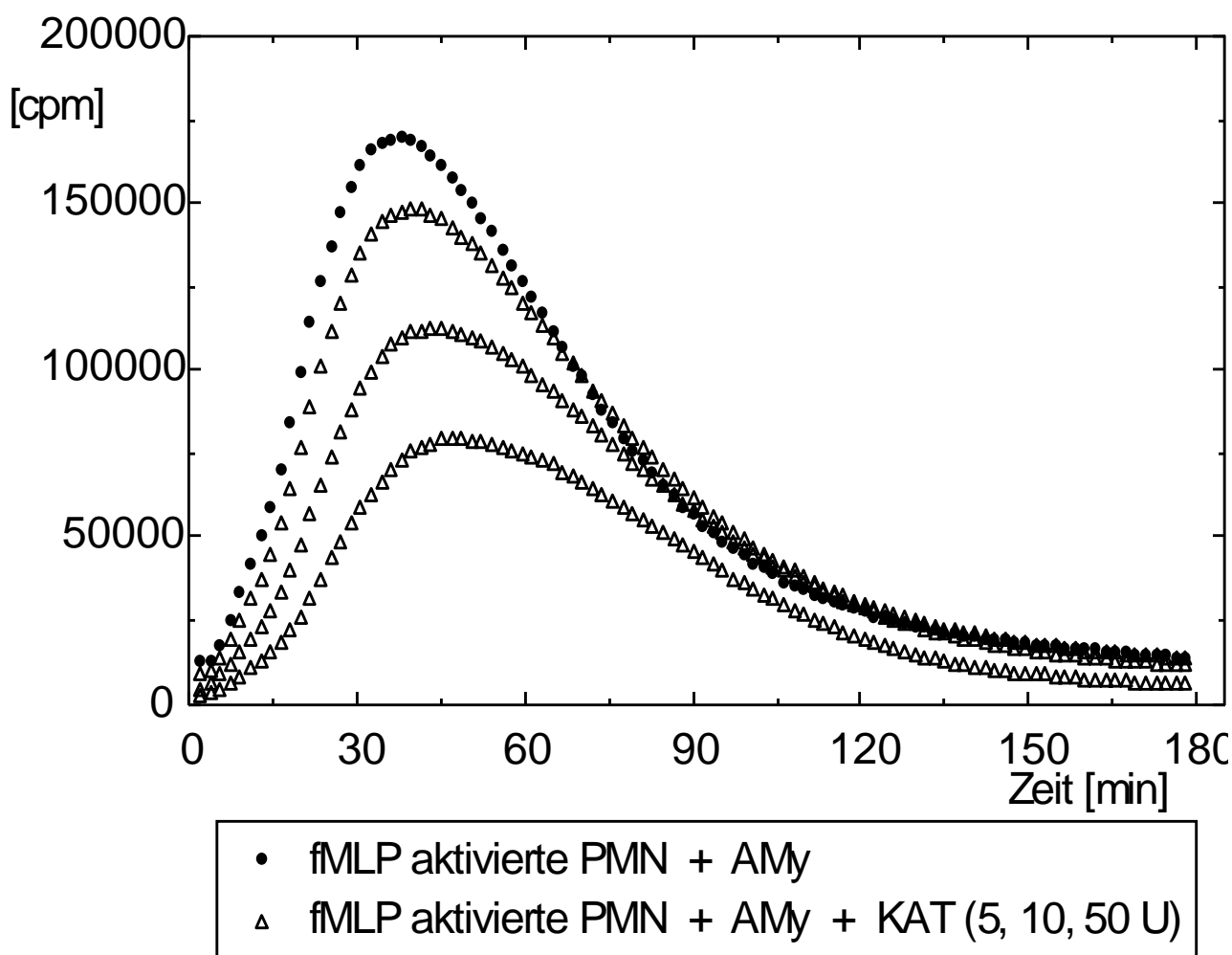


Abb. 10: Kinetik des fMLP Assay in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (AMy) bzw. Zusatz von Katalase (KAT) zur Probe

4.1.3.2.3. Glutathion-Peroxidase reduziert das Lumineszenz-signal

Glutathion-Peroxidase ist ein starker Radikalfänger, dies zeigt sich an einer deutlichen Reduktion des Signals von aktivierten PMN in Kombination mit anoxischen Myozyten im Biolumineszenzassay. Dabei vermindert sich der „oxidative burst“ der fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von Glutathion auf 52%. Die anderen eingesetzten Radikalfänger (SOD und Katalase) sind der Pufferwirkung von Glutathion-Peroxidase geringfügig überlegen, jedoch ist die Wirkung von GP als „scavenger“ in der Biolumineszenzprobe eindeutig und mit der Fähigkeit, das Signal um etwa die Hälfte zu reduzieren, überzeugend.

4.1.3.2.4. Die „scavenger“ zeigen additive Wirkung

Die verschiedenen Radikal-„scavenger“ fangen unterschiedliche Radikalspezies ab (siehe auch Abbildung 32), indem sie chemische Verbindungen mit den verschiedenen Sauerstoffprodukten eingehen. So entsteht durch SOD aus dem Sauerstoffradikal $O_2^{\cdot -}$ Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2), und in Gegenwart von Katalase wird H_2O_2 in O_2 und H_2O überführt. Diese Tatsache erklärt, warum man bei Zugabe von Superoxid-Dismutase und Katalase zum Biolumineszenzassay den folgenden additiven Effekt beobachten kann, wie es der zusammenfassende Vergleich in Abbildung 12 zeigt. Durch Zusatz von SOD und Katalase zur Biolumineszenzprobe wird der oxidative burst fMLP aktivierter Granulozyten in Anwesenheit von 12h anoxischen Myozyten weiter auf bis zu 20% gesenkt.

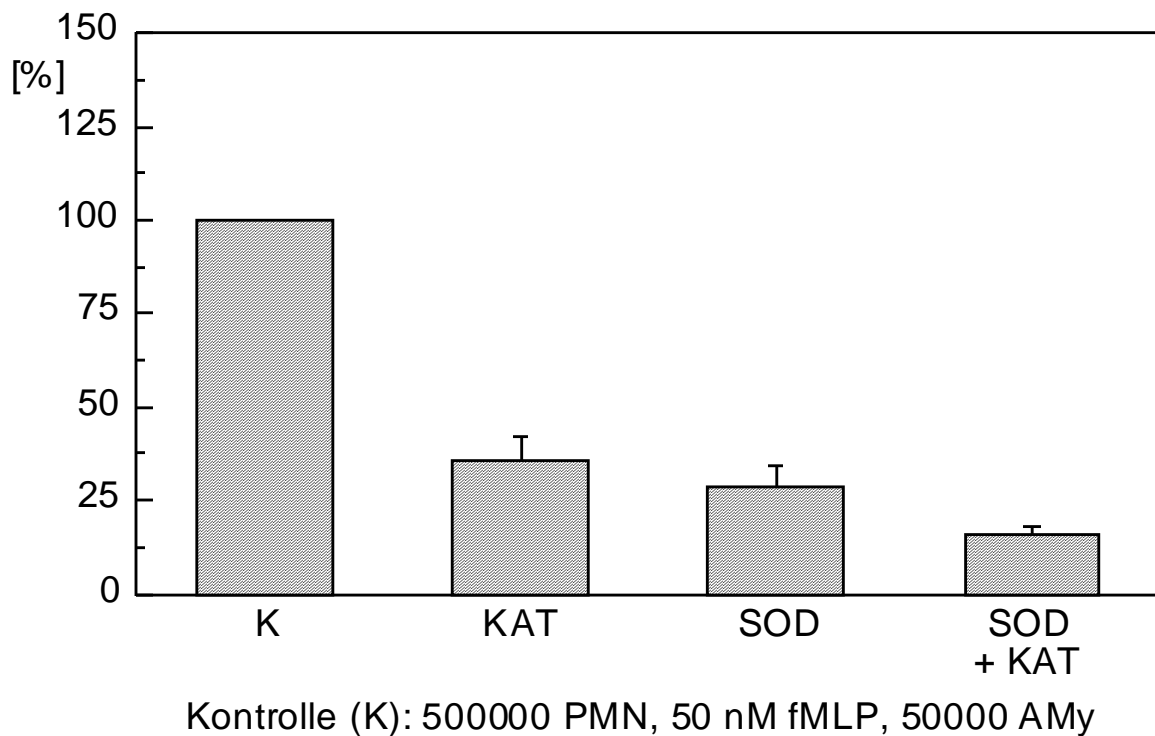


Abb. 11 a: Darstellung der additiven Wirkung von SOD und Katalase (KAT) auf das Biolumineszenzsignal. Der Referenzwert (100%) stellt das Signal von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten dar

| Nr. | Bezeichnung | Mean | Stand. Error | Vergleich | Equal-Variance | Aspin Welch | n | Stand. Error of Mean |
|-----|-----------------|------|--------------|-----------|----------------|-------------|----|----------------------|
| 1 | ... + SOD | 28,7 | 5,6 | 1-3<>0 | p=0,048 | p=0,055 | 10 | 1,77 |
| 2 | ... + KAT | 35,8 | 6,1 | 2-3<>0 | p=0,006 | p=0,009 | 10 | 1,9 |
| 3 | ... + SOD + KAT | 15,5 | 2,6 | | | | 10 | 0,8 |

Abb. 11 b: Statistische Auswertung des Einflusses von Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (KAT) und der Wirkung von SOD und KAT auf das Signal von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten

4.1.3.3. Die Wirkung von Kalziumantagonisten auf den „oxidative burst“

Physiologische Reaktionen der neutrophilen Granulozyten wie Degranulation, Migration und der „respiratory burst“ sind kalziumabhängige Vorgänge. Kalzium triggert wichtige Stoffwechselvorgänge der PMN und hat eine zentrale Rolle in der Aktivierung der neutrophilen Granulozyten. Kalzium ist weiterhin essentiell für die Aktivität einiger Enzymsysteme (z.B. der kalziumabhängigen Phospholipase D, Phospholipase C oder der NADPH-Oxidase) oder für das Funktionieren von kontraktilen zytosolischen Zellkomponenten. Durch fMLP kommt es auch zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (durch Eröffnung von Kalziumkanälen in der Zellmembran) der Neutrophilen (*Rosales et al. 1992*). Dieser Umstand kann erklären, auf welche Weise Kalziumantagonisten (hier: Verapamil) den oxidative burst fMLP aktivierter PMN reduzieren können.

Wie zu Beginn erwähnt ist ein Effekt der getesteten Substanzen neben den PMN auch auf die anoxischen Myozyten in der Probe nicht auszuschließen. Theoretisch denkbar wäre es für die bereits demonstrierten Ergebnisse mit Staurosporin und den Radikalfängern (KAT, SOD und GP) im Assay; eine positive Wirkung ist aber für die folgenden Substanzen aus den pharmakologischen Gruppen der Kalziumantagonisten, β -Agonisten, Adenosin-Agonisten und im Falle der neuen anti-ischämischen Substanz nachvollziehbarer, wegen bekannten Wirkungen auf die Kardiomyozyten. Kalzium spielt eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel und Energiehaushalt der Myozyten. Durch verschiedene Kanäle gelangt Kalzium ins Zytoplasma: Es existieren Kalzium-Kanäle in der äußeren Zellmembran und am sarkoplasmatischen Retikulum (SER) der Zelle. Durch die Anoxie kommt es zu Ionenverschiebungen, was eine Kalziumüberladung und eine Hyperkontraktion der Herzmuskelzelle zur Folge hat. Die Kalziumantagonisten können eine positive Auswirkung auf die durch Kalziumüberladung gefährdeten anoxischen Myozyten haben, indem diese Substanzen die kalziumbedingte Hyperkontraktion der anoxischen Myozyten bessern oder verhindern, schmälern sie die schädigende Wirkung durch die Anoxie und reduzieren eventuell indirekt die Ausbeute an freien Radikalen der aktivierten PMN in Gegenwart der anoxischen Myozyten. Verändert man den Zustand der anoxischen Myozyten könnte dadurch auch die wahrscheinlich reaktive Sauerstoffradikalproduktion der Neutrophilen verändert werden. Die eingesetzten Pharmaka wirken also direkt auf die aktivierten PMN, jedoch ist ein zusätzlicher (positiver) Effekt auf die Myozyten im Assay nicht ausgeschlossen.

Trimetazidin (TMZ) ist eine neuartige anti-ischämische Substanz mit noch ungeklärten Wirkungs-mechanismus. Neben dem globalen anti-ischämischen Effekt auf das Myokard (die mit TMZ behandelten Myozyten überstehen ischämische Situationen besser) schreiben einige Autoren Trimetazidin weitere Wirkungskomponenten im Sinne eines Kalziumantagonisten oder eines „scavengers“ zu (*Tsimoyiannis et al.1993*). In einigen Studien (*de Leiris 1993* und *Fabiani et al.1992*) konnte der positive Effekt von TMZ auf die ischämischen Myokardzellen gezeigt werden. TMZ führte zu einer verbesserten Energieausbeute (ATP und Phosphatkonzentrationen in den Zellen blieben erhalten), zu einer Verbesserung der

Ischämie bedingten Azidose, des weiteren wirkt Trimetazidin membranstabilisierend und verhindert Schäden an den Mitochondrien der Myokardzellen bei Ischämie (Kay *et al.* 1995).

Die Wirkung von Verapamil und Trimethazidin (TMZ) auf den „burst“ aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten, veranschaulicht folgende Kinetikkurve in Abbildung 12.

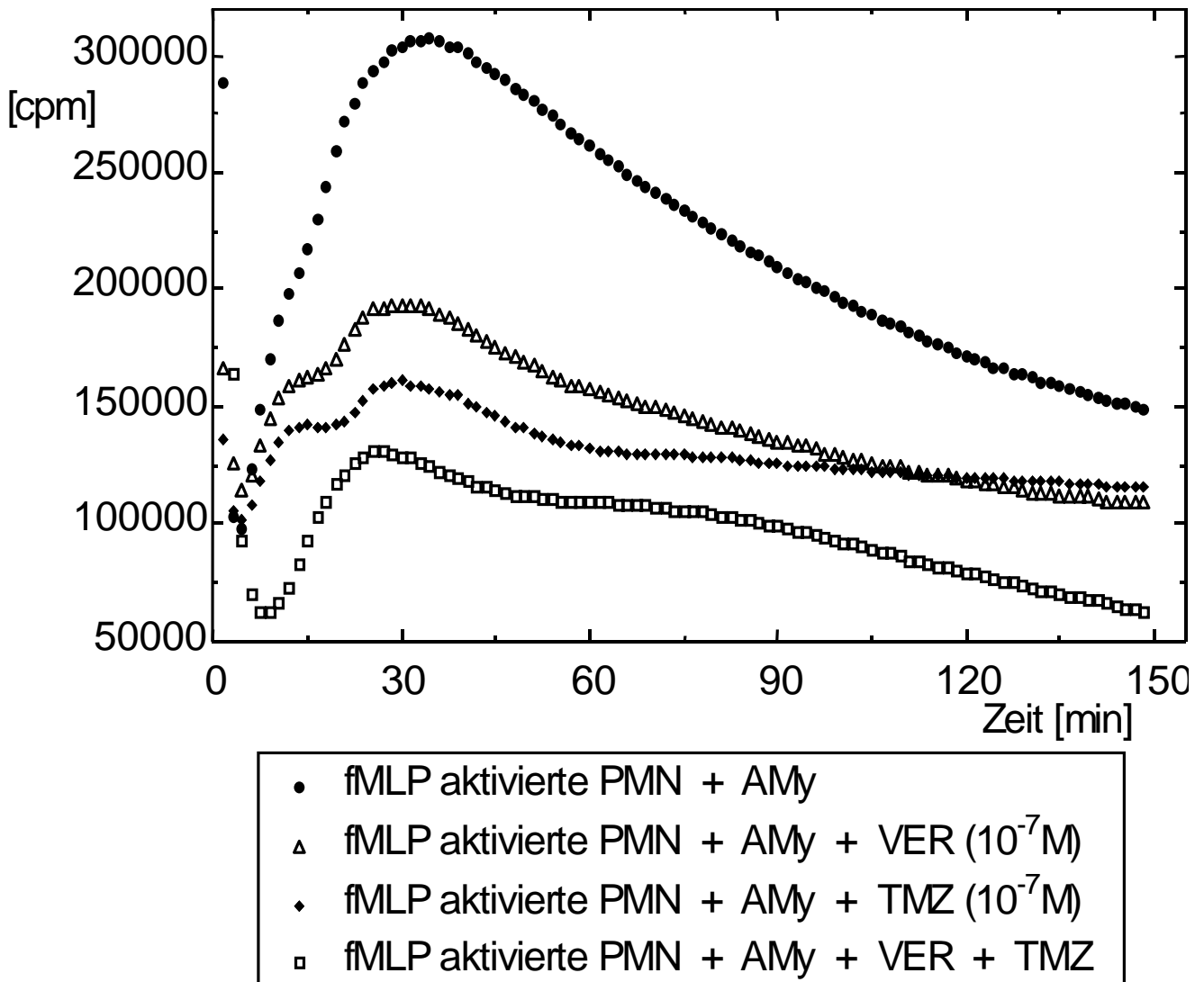


Abb. 12: Kinetikgraphik der Wirkung von Verapamil (VER) und Trimethazidin (TMZ) im Assay mit fMLP aktivierten PMN und anoxischen Myozyten (AMy)

In einem weiteren Experiment läßt sich ein zusätzlicher Effekt von TMZ erkennen. Der „burst“ der PMN ist additiv reduziert, das bedeutet, daß Trimetazidin neben seiner kalziumblockierenden Eigenschaft noch eine zusätzliche Abschwächung des „burst“ bewirkt, etwa eine „scavenger“-Funktion, oder aber, es blockiert zusätzlich andere, nicht durch Verapamil beeinflussbare Kalziumkanäle der Zelle. Die folgende zusammenfassende Statistik in Abbildung 13 verdeutlicht die Ergebnisse dieser Experimente.

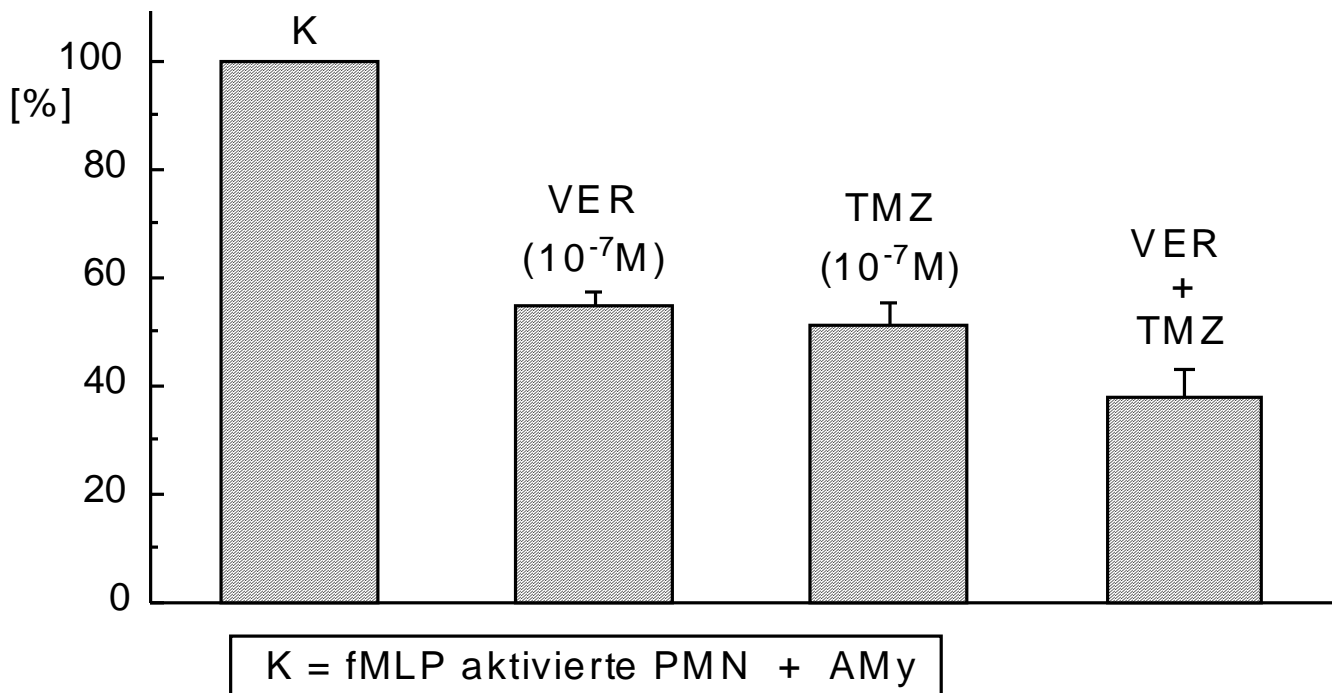


Abb. 13 a: Additiver Effekt im Experiment mit Verapamil (VER) und TMZ als Zusatz zum fMLP Assay mit anoxischen Myozyten (AMy)

| Nr. | Bezeichnung | Mean | Stand. Error | Vergleich | Equal-Variance | Aspin Welch | n | Stand. Error of Mean |
|-----|---------------------------|-------|--------------|-----------|----------------|-------------|----|----------------------|
| 1 | fMLP aktivierte PMN + AMy | 194,3 | 15,8 | | | | 13 | 4,38 |
| 2 | ... +VER | 48,9 | 2,7 | 1-2<>0 | P<0,001 | p<0,001 | 10 | 0,85 |
| | | | | 2-4<>0 | P=0,261 | p=0,232 | | |
| 3 | ... + TMZ | 53,2 | 2,67 | 1-3<>0 | P<0,001 | p<0,001 | 7 | 1,0 |
| | | | | 3-4<>0 | P=0,027 | p=0,028 | | |
| 4 | ... +TMZ+VER | 44,4 | 2,3 | 1-4<>0 | P<0,001 | p<0,001 | 7 | 0,8 |

Abb. 13 b: Statistische Auswertung der Ergebnisse mit Verapamil (VER) und Trimetazidin (TMZ) im Assay mit fMLP aktivierten PMN und anoxischen Myozyten. Der Kontrollwert (100%) bezieht sich auf das Signal von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten

4.1.3.4. Die Verminderung des „burst“ in Anwesenheit des β_1 -Agonisten Isoproterenol

Isoproterenol ist ein β_1 -Agonist an adrenergen Rezeptoren. Auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten befinden sich unter anderem auch adrenerge Rezeptoren, die durch Isoproterenol besetzt werden können. Isoproterenol verändert den „burst“ der fMLP aktivierten PMN über die Interaktion mit dem Rezeptor und ist in der Lage, die Aktivität der NADPH-Oxidase und die Produktion von Sauerstoffradikalen zu vermindern. Isoproterenol führt via des β -adrenergen Rezeptors zu einer Aktivierung der Adenylat Cyklase und somit zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP. Der hohe cAMP-Spiegel bewirkt eine Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität (*Kilfeather et al. 1991*). Im zusammenfassenden Vergleich der Ergebnisse kann der Zusatz von Isoproterenol das Signal von aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (Kontrollwert) um 48 % reduzieren. An folgendem repräsentativen Kinetikgraph in Abbildung 14 wird die Fähigkeit von Isoproterenol den „oxidative burst“ zu bremsen, veranschaulicht.

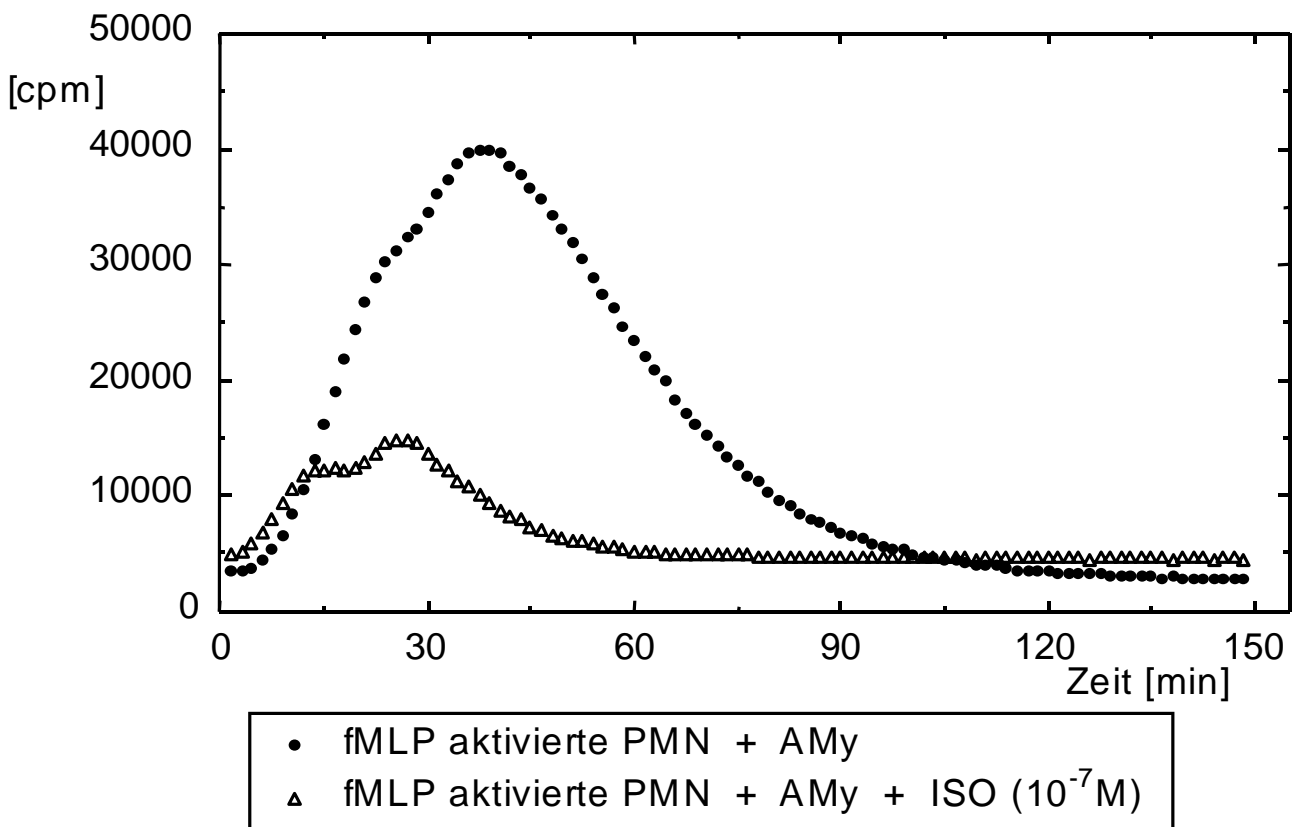


Abb. 14: Isoproterenol (ISO) als Zusatz zum Assay mit fMLP aktivierten PMN und anoxischen Myozyten, dargestellt als Kinetikgraph

4.1.3.5. Der Einfluß von verschiedenen Adenosin-Agonisten und Antagonisten auf den „burst“ aktivierter Neutrophiler

Auf der Membranoberfläche der neutrophilen Granulozyten befinden sich spezifische Rezeptoren für Adenosin und verwandte Verbindungen. Die Adenosin Rezeptoren teilt man je nach Spezifität in A₁ und A₂-Rezeptoren ein. Agonisten an Adenosin-Rezeptoren, insbesondere Agonisten mit größerer Affinität zu A₂-Rezeptoren, vermögen den „oxidative burst“ der fMLP aktivierten PMN zu unterdrücken. Adenosin führt zu einer Zunahme des zellulären cAMP, und über diesen Mechanismus zu einer Reduktion der Sauerstoffradikalbildung aktivierter PMN. Wie die folgende Graphik zeigt, sind besonders **Adenosin** und **NECA** (5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin) mit stärkerer Wirkung am A₂-Rezeptor, aber auch die A₁-Agonisten **PIA** (R(-)-N6-(2-Phenylisopropyl)adenosin) und **CPA** (N6-Cyclopoentyladenosin), letzterer in geringerem Maße in der Lage, das Signal im Vergleich zum Kontrollwert zu reduzieren. Bei Verwendung von Adenosin-Rezeptor-Antagonisten, wie Aminophyllin (AP) im Biolumineszenzassay bleibt das Signal im Vergleich zum Kontrollwert unverändert. Adenosin hat negativ chronotrope Effekte auf die kardialen Schrittmacherzellen, negativ dromotrope Einflüsse auf die atrio-ventrikuläre Überleitung, antiadrenerge und vasodilatorische Effekte auf die Blutgefäße. Eine Übersicht über die Wirkung von Adenosin-Agonisten auf die Sauerstoffradikale im Assay gibt das folgende Diagramm

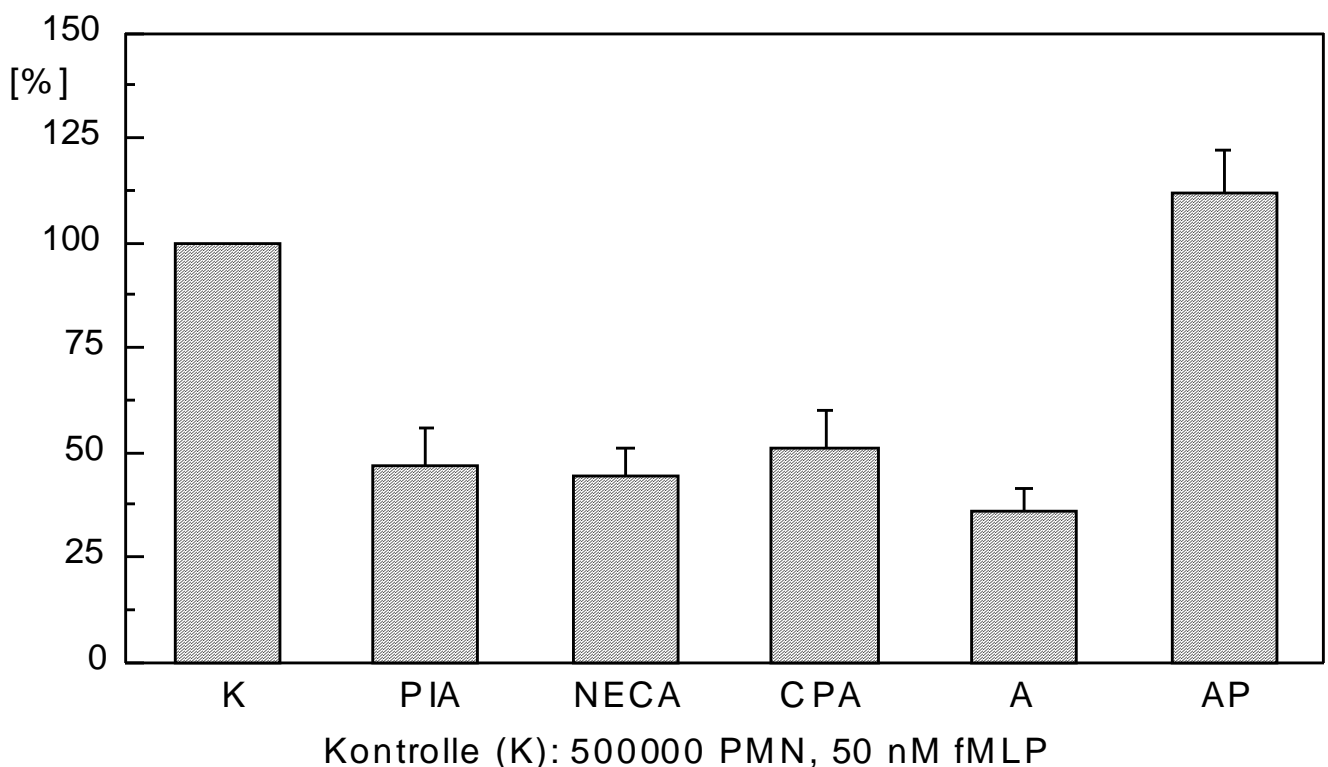


Abb. 15 a: Histogramm zur Veranschaulichung der Effekte von PIA, CPA, NECA und AP im Biolumineszenzassay mit fMLP aktivierten PMN und anoxischen Myozyten

| Nr. | Bezeichnung | Mean | Stand. Error | Vergleich | Equal-Variance | Aspin Welch | n | Stand. Error of Mean |
|-----|--------------------|-------|--------------|-----------|----------------|-------------|----|----------------------|
| 1 | 12h AMy | 194,3 | 15,8 | | | | 13 | 4,38 |
| 2 | 12h AMy + PIA | 45,3 | 7,7 | 1-2< >0 | p<0,001 | p<0,001 | 8 | 2,7 |
| 3 | 12h AMy + NECA | 44,4 | 6,3 | 1-3< >0 | p<0,001 | p<0,001 | 7 | 2,38 |
| 4 | 12h AMy.+ CPA | 53,3 | 6,1 | 1-4< >0 | p<0,001 | p<0,001 | 7 | 2,3 |
| 5 | 12h AMy + Adenosin | 35,71 | 5,6 | 1-5< >0 | p<0,001 | p<0,001 | 7 | 2,1 |
| 6 | 12h AMy + AP | 111,5 | 10,5 | 1-6< >0 | p=0,002 | p=0,001 | 7 | 3,9 |

Abb. 15 b: Statistische Auswertung der Adenosin-Agonisten (NECA, PIA und CPA) sowie des Adenosin-Antagonisten Aminophyllin (AP) im Assay mit fMLP aktivierten PMN und anoxischen Myozyten

4.2. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Beobachtung in der Co-Kultur

Als Co-Kultur wird hierbei eine Myozytenkultur (anoxisch oder normoxisch) bezeichnet, der neutrophile Granulozyten zugegeben werden. Die Interaktion der beiden Zellarten läßt sich gut im Lichtmikroskop beobachten: So kann man Phänomene wie Adhärenz oder Chemotaxis der PMN lichtmikroskopisch erfassen und mittels der Vitalitätsprüfung mit Trypanblau Aussagen über das Überleben oder Absterben der Myozyten in Anwesenheit der durch fMLP aktivierten Neutrophilen machen. Vitale Zellen sind in der Lage, bei intakten Membranen den Farbstoff Trypanblau auszuschließen, während bei abgestorbenen Zellen die Zellmembranen für den Farbstoff durchlässig werden, so daß diese Myozyten sich blau anfärben. Die Interaktionen von aktivierten PMN und Myozyten in der Co-Kultur wurden bereits in der Arbeit von *Z. Szalay* beschrieben und durch lichtmikroskopische Photographien untermauert (*Z. Szalay, 1997*).

Diese Ergebnisse sollen bezüglich der Co-Kultur an dieser Stelle kurz zusammengefaßt werden:

1. Normoxische Myozyten überleben in der Co-Kultur mit aktivierten PMN länger als 6 Tage, und es zeigt sich zur Kontrollkultur (normoxische Myozyten ohne PMN-Inkubation) kein Unterschied, was die Absterberate betrifft.
2. Anoxische Myozyten sterben innerhalb 24h nach Co-Inkubation mit aktivierten PMN ab, während die Kontrollkultur (anoxische Myozyten ohne PMN-Inkubation) einen überwiegenden Anteil an vitalen Zellen über einen Zeitraum von mehr als 6 Tagen aufweist.

Die anoxischen Myozyten überleben daher in der Co-Kultur mit aktivierten neutrophilen Granulozyten deutlich schlechter als normoxische Myozyten, die nicht von den PMN attackiert werden, oder die den freien Sauerstoffradikalen besser widerstehen können (im Sinne einer besseren Anpassungsfähigkeit gegenüber Stressoren, hier: Die unmittelbare Nähe zu aktivierten neutrophilen Granulozyten). Die normoxischen Myozyten sind durch ihr intaktes zelluläres Radikalfängersystem (insbesondere durch das SOD-System) in der Lage, trotz der durch die aktivierten PMN gebildeten Sauerstoffradikale in der Co-Kultur längere Zeit (> 6 Tage) zu überleben, die normoxischen Myozyten „puffern“ die Radikale ab. Die Absterberate der normoxischen Zellen steigt deutlich durch Prä-Inkubation der Myozyten mit dem SOD-Inhibitor in der Co-Kultur. Im Biolumineszenzassay zeigt sich analog dazu eine deutlich vermehrte Radikaldetektion (*Z. Szalay, 1997*).

Vor der Biolumineszenzmessung werden die Myozyten mittels Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in das Meßröhrchen transferiert. Dieser mechanische Vorgang entfällt bei der Beobachtung der Co-Kultur, denn einmal von der Kulturschale gelöste Myozyten können sich nicht erneut anheften, sie sterben schneller ab, was eine längere Beobachtung unmöglich machen würde. Die Myozyten bleiben also im angehefteten Zustand auf den Kulturschalen, das Medium wird durch den im Assay verwendeten Hanks-Puffer ersetzt, der Stimulus (fMLP) und die polymorphkernigen Neutrophilen werden der Kultur zugesetzt. In der Co-Kultur lassen sich Phänomene wie die Chemotaxis der Neutrophilen anhand einer Photosequenz dokumentieren.

Zum einen sind die chemotaktisch gesteuerten Bewegungen der aktivierten PMN interessant die sich im Laufe der Abbildungen verfolgen lassen, zum anderen kann man ebenfalls eine Reaktion der Myozyten auf die aktivierten Granulozyten beobachten. Die Myozyten sind 100-150µm große Zellen und sind an ihrer typischen stäbchenförmigen Morphologie zu erkennen. Weiterhin sind auf den Abbildungen auch Myozyten dargestellt, welche eine veränderte Form aufweisen. Durch Kontraktion und Umorientierung ihrer intrazytoplasmatischen kontraktilen Elemente entstehen gedrungenere Zellformen, welche sich soweit verkürzen, daß „abgerundete“ Myozyten entstehen. Diese kugeligen Zellen erinnern morphologisch nicht mehr an den ursprünglichen typischen Myozyten. Auch die polymorphkernigen Neutrophilen sind auf den folgenden Abbildungen in großer Zahl vorhanden, das Verhältnis Myozyt zu PMN beträgt etwa 1:10. Die Neutrophilen sind als wesentlich kleinere (Grösse: 8-14µm) runde Zellen zu erkennen. Die folgenden zwei Abbildungen (Abb. 16a und 16b) vermitteln einen Eindruck, wie die Granulozyten sich in der Co-Kultur um bestimmte Myozyten sammeln. In den dargestellten Abbildungen zeigt sich die Adhärenz der aktivierten Neutrophilen sowohl an stabförmige, als auch an bestimmte abgerundete Myozyten. Zwischen der Abbildung 16a und der Abbildung 16b liegt eine Zeitspanne von 120 Minuten.

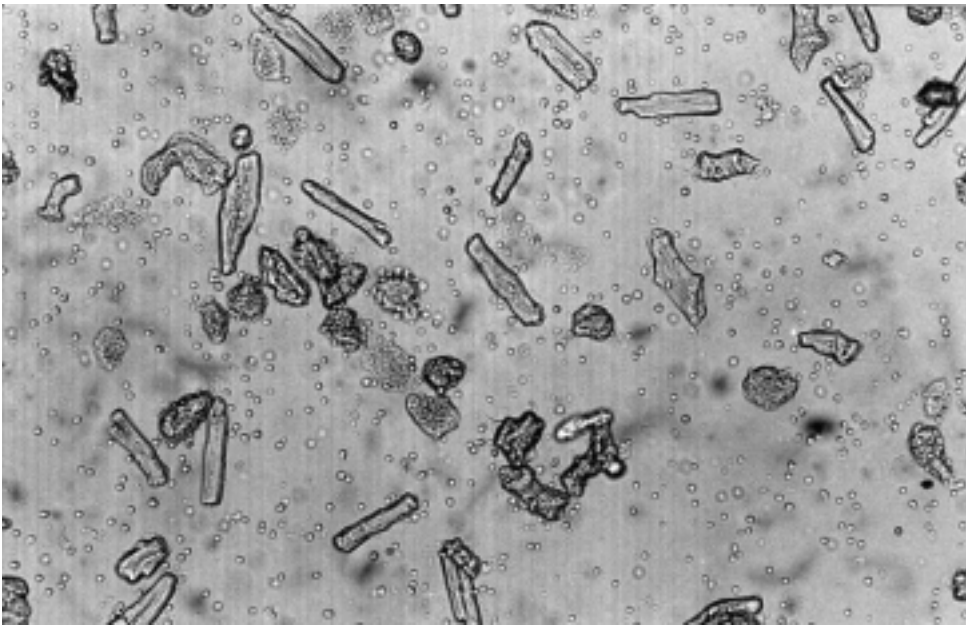


Abb. 16 a, 16 b : Chemotaxis von fMLP aktivierten Neutrophilen in der Kultur mit Myozyten innerhalb von 120 Minuten, Vergrößerung: 100fach, keine Färbung

Die folgenden lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abbildungen 17a-d) sind mit einer wesentlich größeren Vergrößerung fotografiert und machen die Reaktion der Myozyten (hier normoxische Myozyten) auf die aktivierten PMN in der Co-Kultur deutlich. Die Photos sind jeweils in Abständen von 30 Minuten aufgenommen und zeigen, wie sich die dargestellte Gruppe von Myozyten mit zunehmender Zeit verändert. Die Herzmuskelzellen verkürzen sich, sie erscheinen gedrungener durch die beginnende Umordnung der Zellfilamente. Anfänglich sind die Zellen noch stabförmig (Abb. 17a), der Endzustand nach 120 Minuten zeigt einen der Myozyten mit fast schon kugeliger Gestalt (Abb. 17d) als ein Zeichen eines fortschreitenden Zell-“spreadings“ in der Myozytenkultur:

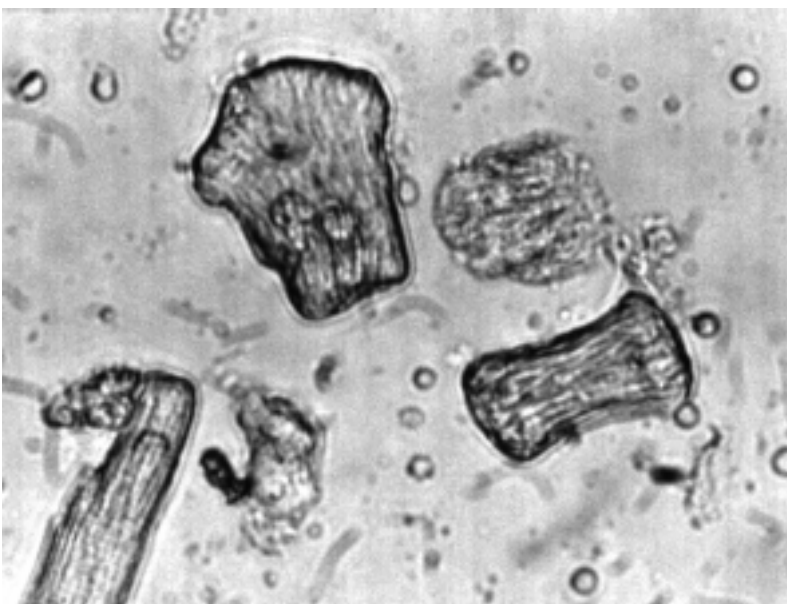
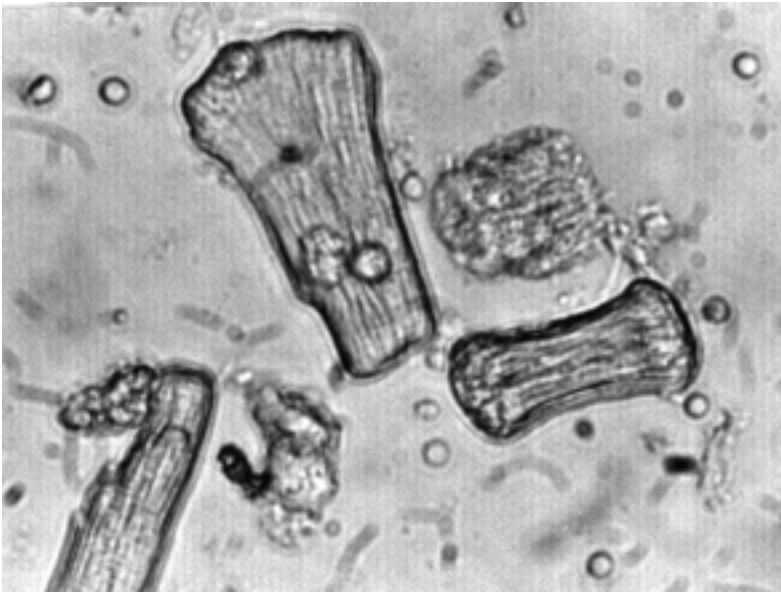


Abb. 17a,b: Myozyten und PMN als Ausschnittsvergrößerung (250fache Vergrößerung), Nativpräparat ohne Färbung, Abb. 17b zeigt die Morphologie der Zellen nach 30 Minuten

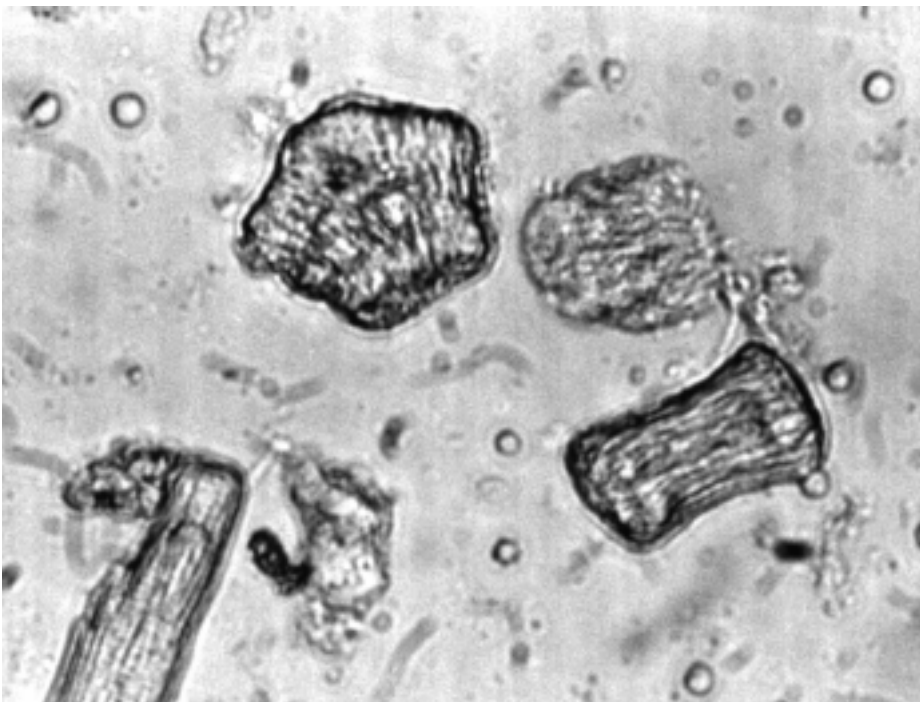
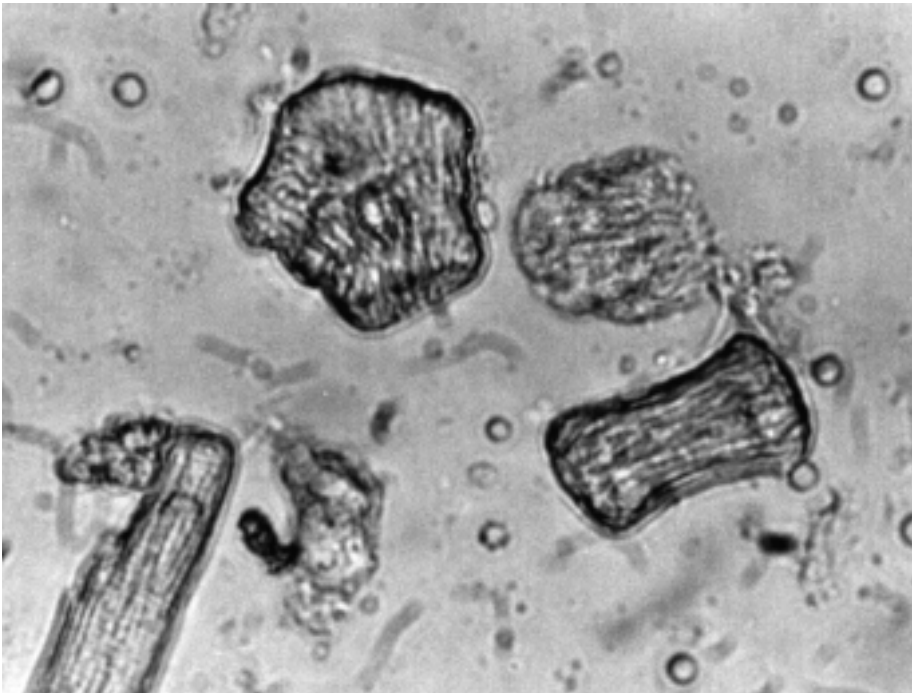


Abb. 17c,d: Reaktion von Myozyten auf die Inkubation von aktivierten PMN (zwischen den Abbildungen liegt jeweils eine Zeitspanne von 30 Minuten), Nativpräparat und Ausschnittsvergrößerung (250fache Vergrößerung)

Einige Myozyten reagieren auf die Co-Inkubation mit aktivierten PMN mit einer beschleunigten „Abrundung“, d.h. die Myozyten verändern ihre typische Gestalt, ziehen sich zusammen und werden zu rundlichen Zellen. Die Veränderung der Form der Myozyten vom stabförmigen zum abgerundeten Zustand, der auch mit dem Verlust der typischen Querstreifung (Parallele Anordnung von Aktin und Myosin-Filamenten) einhergeht, ist ein normales Phänomen in der Langzeitkultur der Kardiomyozyten. Dieses von *Piper* als Zell-„spreading“ bezeichnetes Phänomen tritt in Anwesenheit von aktivierten PMN in der Zellkultur von normoxischen Myozyten zeitlich eher auf (*Piper, 1990*)

Die Wechselwirkungen von aktivierten PMN und Myozyten können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Die aktivierten PMN reagieren auf die Myozyten:

- **Biolumineszenzassay:** Gesteigerte Radikalproduktion im Fall der anoxischen Myozyten, verminderte Sauerstoffradikaldetektion bei normoxischen Myozyten.
- **Lichtmikroskopie:** Chemotaxis und Aggregation in Anwesenheit von anoxische Myozyten.

2. Die Myozyten reagieren auf die Anwesenheit von aktivierten PMN:

- **Biolumineszenzassay:** Abpufferung der Radikale durch normoxische Myozyten, Unvermögen die Radikale abzufangen wegen Schädigung des endogenen Radikalfängersystems durch die Ischämie (in-vitro: Anoxie) im Falle der anoxischen Myozyten.
- **Lichtmikroskopie:** Beschleunigter Entdifferenzierungsprozeß der normoxischen Myozyten als aktive Reaktion auf die Co-Inkubation, vermehrtes Absterben der anoxischen Myozyten in der Co-Kultur von aktivierten PMN.

Weitere Hinweise auf die Interaktion zwischen aktivierten Neutrophilen und Myozyten liefern Vergleiche der Absterberate von Myozyten (NMy bzw. AMy) in der Co-Kultur von fMLP aktivierten PMN. Über das Verhältnis von vitalen zu abgestorbenen Zellen sagten die bisher demonstrierten Abbildungen wenig aus. Eine Methode den Zelltod zu detektieren ist Anfärbbarkeit der Zellen mit dem Farbstoff Trypanblau zu prüfen. Es ist trügerisch, die Gestalt der Myozyten als Kriterium diesbezüglich zu betrachten und daraufhin Rückschlüsse auf die Vitalität der Zelle machen zu wollen, denn es gibt z.B verschiedene vitale Formen der Myozyten (stabförmig, abgerundet bis hin zu stark abgeflachten Zellen) im Laufe des kontinuierlichen Vorgangs des sogenannten Zell-„spreadings“.

In der folgenden Aufzählung sind einige morphologische Zustände und deren Vorkommen (als vitale Zellen (1), und (2) als abgestorbene Zellen) benannt:

- **stabförmige Myozyten:**

1. Makroskopisch stabförmige bzw. „rod shaped“ Myozyten kommen in der Kurzzeitkultur von Kardiomyozyten unter optimalen Bedingungen vor. Es sind vitale Zellen, die typische Querstreifung durch Anordnung der Aktin und Myosin-Filamente ist erhalten. „Rod shaped“ Myozyten in der Kultur kommen dem in-vivo Zustand der Herzmuskelzellen am nächsten.
2. Im stabförmigen Zustand abgestorbene Zellen sind z.B. vermehrt in der Co-Kultur von anoxischen Myozyten mit aktivierten PMN zu finden. Hierbei war der zusätzlich schädigende Einfluß der aktivierten PMN vermutlich so groß, das der Myozyt abstirbt und es zu keinerlei aktiven Reaktion mehr auf den zusätzlichen Stressor (etwa im Sinne einer beschleunigten Abrundung) kommen kann.

- **Abgerundete Myozyten:**

1. Abgerundete bzw. entdifferenzierte Myozyten sind z.B in einer Langzeitkultur von Myozyten unter optimalen Bedingungen zu beobachten. Die Zellen reagieren aktiv auf die dargebotenen Stressoren in der Kultur (hier die speziellen Bedingungen der Langzeitkultur) indem sie sich abrunden. Die vitalen Zellen verlieren ihre für Myozyten typischen Merkmale wie stabförmige Gestalt und intrazelluläre parallele Anordnung der kontraktilen Filamente.
2. Abgerundete abgestorbene Zellen findet man z.B. vermehrt nach zu langer Kollagenase-Einwirkung während der Myozytenisolation.

Das bedeutet, die Myozyten können in verschiedenen morphologischen Zuständen absterben. Folgende Abbildungen (Abb. 28-30) zeigen die Letalitätsprüfung mit Trypanblau, die abgestorbenen Myozyten nehmen den Farbstoff auf und sie sind in der Schwarz-Weiß-Photographie als die dunkler gefärbten Zellen zu erkennen. Einige Myozyten sterben, indem sie sich zunächst abrunden, wenn der schädigende Einfluß mit der Zeit zunimmt bis er schließlich nicht mehr kompensiert werden kann. Ist der schädigende Faktor zu groß kann eine aktive Anpassung der Myozyten nicht mehr erfolgen und die Zelle stirbt in dem momentanen Zustand ab. Bei starker Schädigung sogar in der typischen stabförmigen Gestalt der Myozyten.

Die folgende Abbildung zeigt zwei vitale Myozyten nach 12h PMN-Inkubation. Der abgerundete Myozyt ist von vier PMN umgeben, dagegen finden sich an dem stabförmigen Myozyten keine adhärenenten PMN.

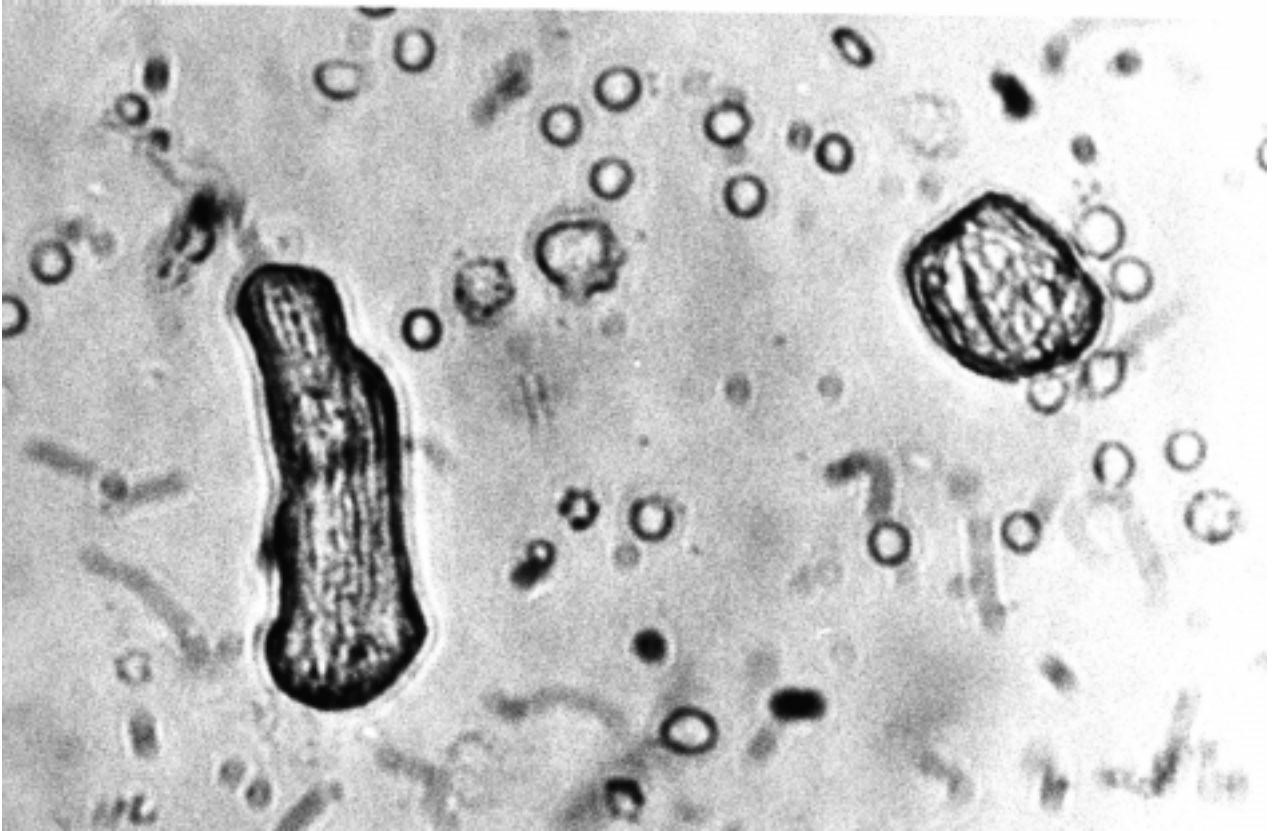


Abb. 18: Zwei unterschiedliche morphologische Zustände der normoxischen Myozyten nach einer Inkubation von aktivierten PMN nach 12h, Adhärenz der Neutrophilen an einem abgerundeten Myozyten, Nativpräparat ohne Färbung, Ausschnittsvergrößerung (250fache Vergrößerung)

Der Abrundungsprozeß der Myozyten ist also eine aktive Reaktion der Zellen auf extern dargebotene Stressoren. Diese Stressoren können unterschiedlich sein (die Anwesenheit von aktivierten PMN, Stoffwechselprodukte, die sich in der Kultur anhäufen, der Zusatz von Serum in der Kultur o.ä.). Diese Stressoren finden sich auch unter optimalen Bedingungen in-vitro in der Langzeitkultur der Myozyten und führen zum sogenannten Zell-“spreading“ der Myozyten, die ca. 5-7 Tage unter normoxischen Bedingungen kultiviert werden. Myozyten in einer 5-7 Tage alten Langzeitkultur zeigen die in Abbildung 19 gezeigte Morphologie. Die Zellen nehmen eine kugelige Gestalt an, sie flachen sich ab, verlieren die intrazytoplasmatische Querstreifung, da sich die kontraktilen Elemente im Zellkörper umordnen, und das Zytoplasma zieht sich zu langen Zellausläufern aus.



Abb. 19: Zell-“spreading“ der Myozyten in der Langzeitkultur, Nativpräparat ohne Färbung als Ausschnittsvergrößerung in 250facher Vergrößerung

Nach diesen vorausschickenden Anmerkungen über Myozyten unter Kulturbedingungen sollen zunächst die morphologischen Unterschiede von normoxischen und anoxischen Myozyten anhand der folgenden Abbildungen (Abb. 20 und 21) aufgezeigt werden.

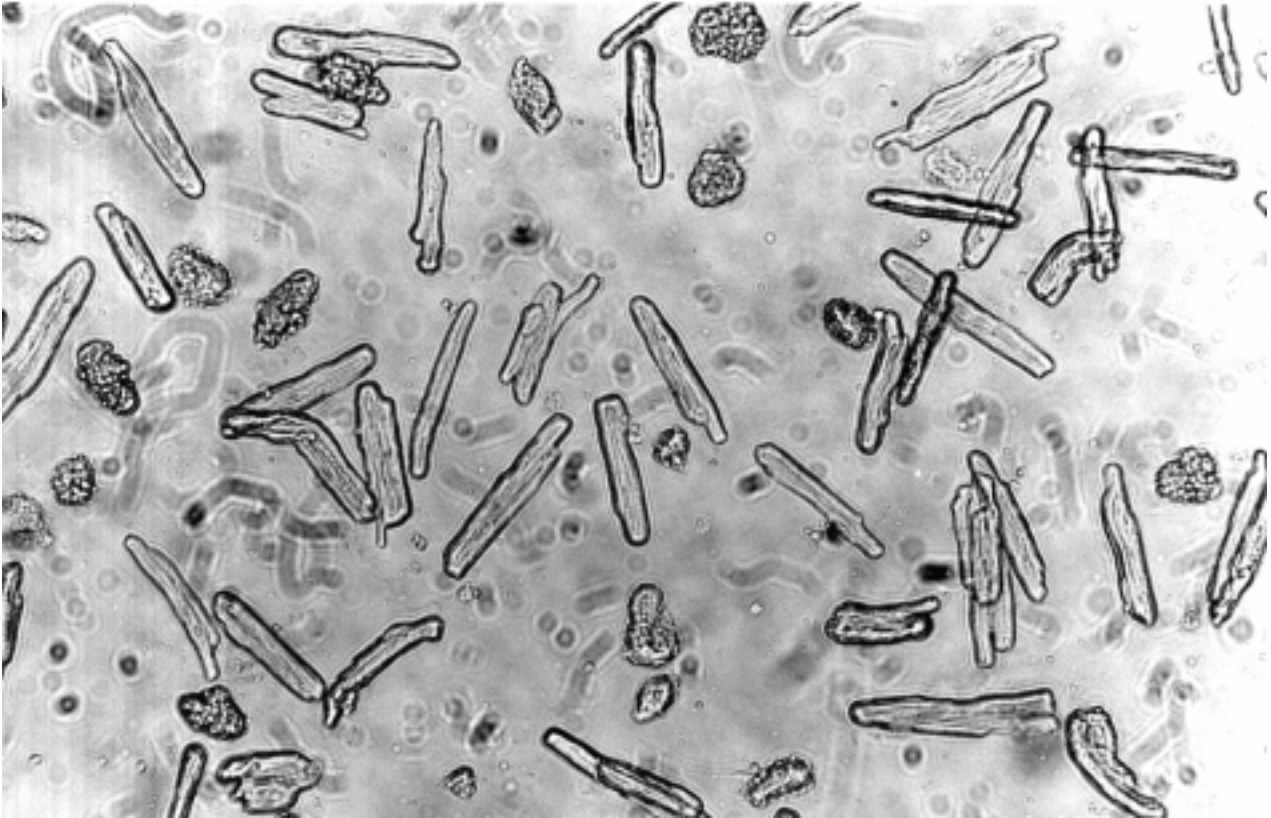


Abb. 20: Zellkultur normoxische Myozyten, Nativpräparat in 150facher Vergrößerung

Die Abbildung zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von unter normoxischen Bedingungen kultivierten Myozyten. Die muskeltypischen kontraktile Filamente (Aktin und Myosin) sind intrazellulär parallel angeordnet, woraus sich die typische Querstreifung ergibt, die lichtmikroskopisch gut zu erkennen ist. Die Myozyten werden nach der Isolation auf Kulturschalen ausgesät. Das geeignete Medium, M 199, mit 4% Serum (FKS), begünstigt das Anheften der Myozyten an die mit Laminin beschichteten Kulturschalen. Dabei sind nur die intakten („rod shaped“) Myozyten (*Piper 1990*) dauerhaft adhären. Durch Wechseln des Mediums (nach 2h wird Medium 199 ohne FKS verwandt) können nun nochmals „Nicht-Myozyten“ während der Isolation abgestorbene Myozyten und Zelltrümmer entfernt werden.



Abb. 21: Zellkultur anoxische Myozyten, Nativpräparat ohne Färbung in 150facher Vergrößerung

Die anoxischen Myozyten sind im Vergleich zu den normoxischen Myozyten etwas kontrahierter. Durch die Hyperkontraktion der Sarkomere sind die Zellen in ihrer Länge etwas kürzer und erscheinen gedrungener. Die Querstreifung ist lichtmikroskopisch gut zu erkennen, die Sarkomere haben sich durch die Kontraktion verkürzt. Außer der Hyperkontraktion fallen keine lichtmikroskopisch beurteilbare Veränderungen durch die Anoxie auf. Das Medium 199 (mit dem Indikator Phenolrot) wechselt mit zunehmender Anoxie die Farbe von Rot über Orange nach Gelb, bedingt durch die Stoffwechselumstellung der anoxischen Myozyten, die zu einer Azidose führt.

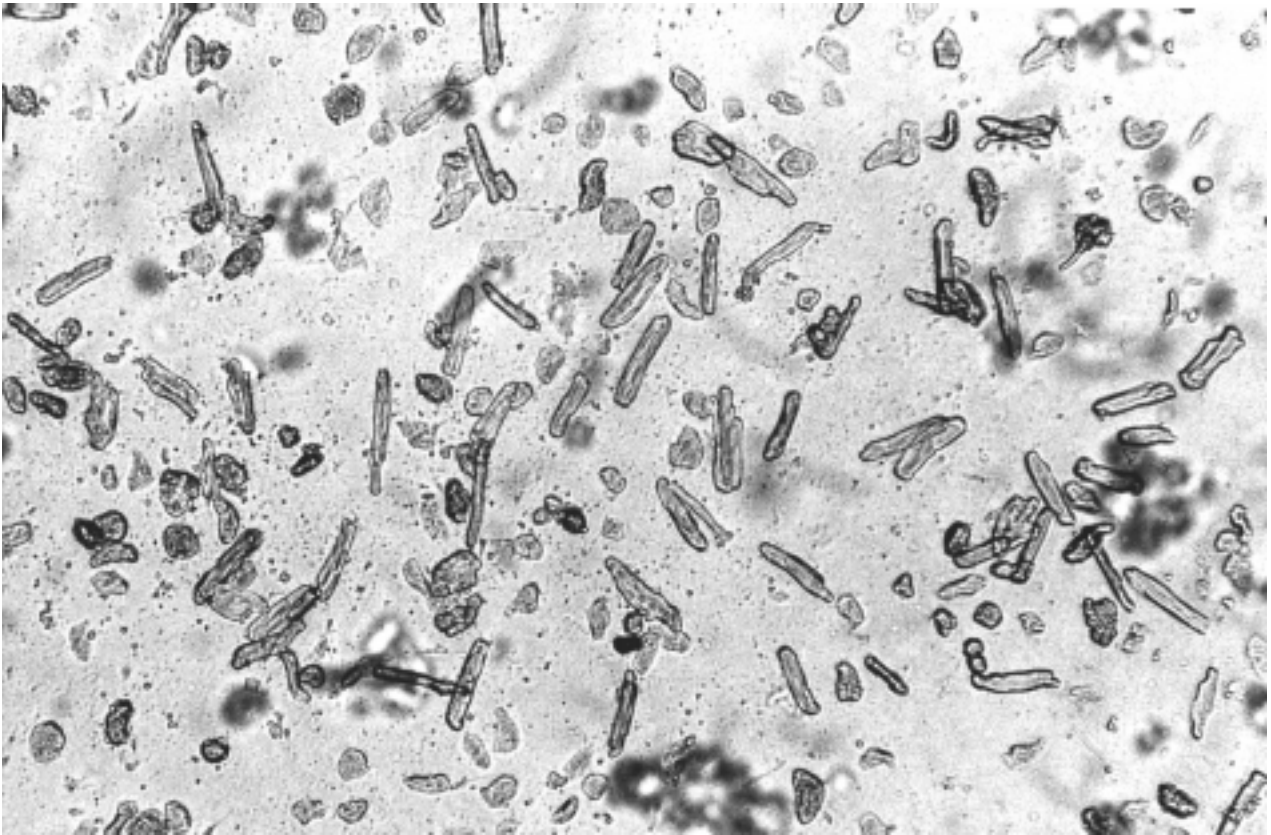


Abb. 22: Zellkultur normoxischer Myozyten mit PMN-Inkubation nach 1h, Nativpräparat ohne Färbung in 100facher Vergrößerung

Die Abbildung 22 zeigt eine Kultur von normoxischen Myozyten nach der Inkubation mit aktivierten PMN nach einer Stunde. Die normoxischen Myozyten sind zu 95% vital, die neutrophilen Granulozyten verteilen sich diffus zwischen den Myozyten. Große Anteile der Zellpopulation behalten zunächst noch die „rod-shaped“-Form. Durch die Trypanblauprobe fallen nur etwa 5% der normoxischen Myozyten als abgestorben auf.

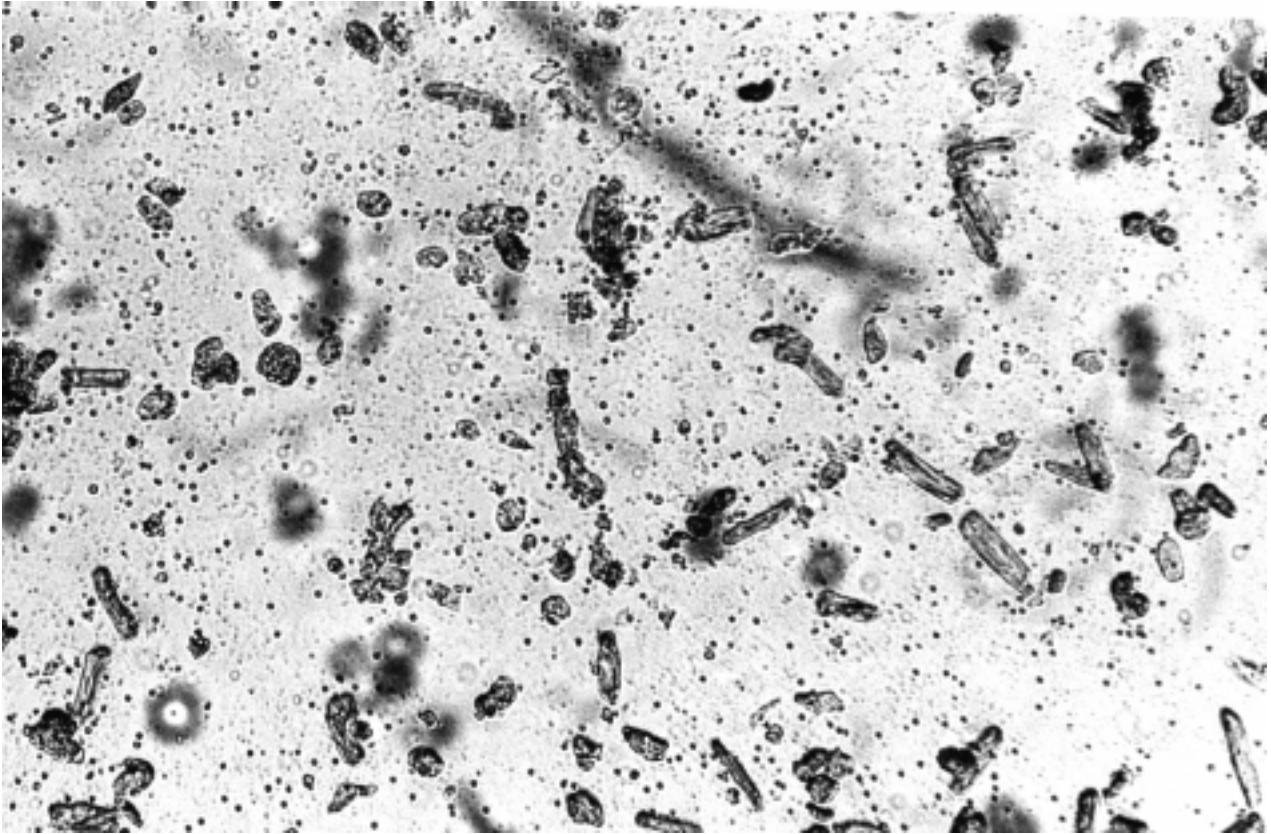


Abb. 23: Zellkultur anoxischer Myozyten mit PMN-Inkubation nach 1h, Nativpräparat ohne Färbung in 100facher Vergrößerung

Die vorhergehende Abbildung (Abb. 23) zeigt die Co-Kultur von 12h anoxischen Myozyten mit der Inkubation von aktivierten PMN, aufgenommen nach einer Stunde. Die aktivierten PMN verteilen sich nicht gleichmäßig, sie sammeln sich um bestimmte Myozyten. Die adhären PMN bilden mit mehreren anoxischen Myozyten größere Zellaggregate. Viele der Zellen haben sich abgerundet und sind nach diesem Vorgang abgestorben, einige der 12h anoxischen Myozyten sind in stabförmigen Zustand abgestorben, was eine spätere Trypanblau-Probe beweist.

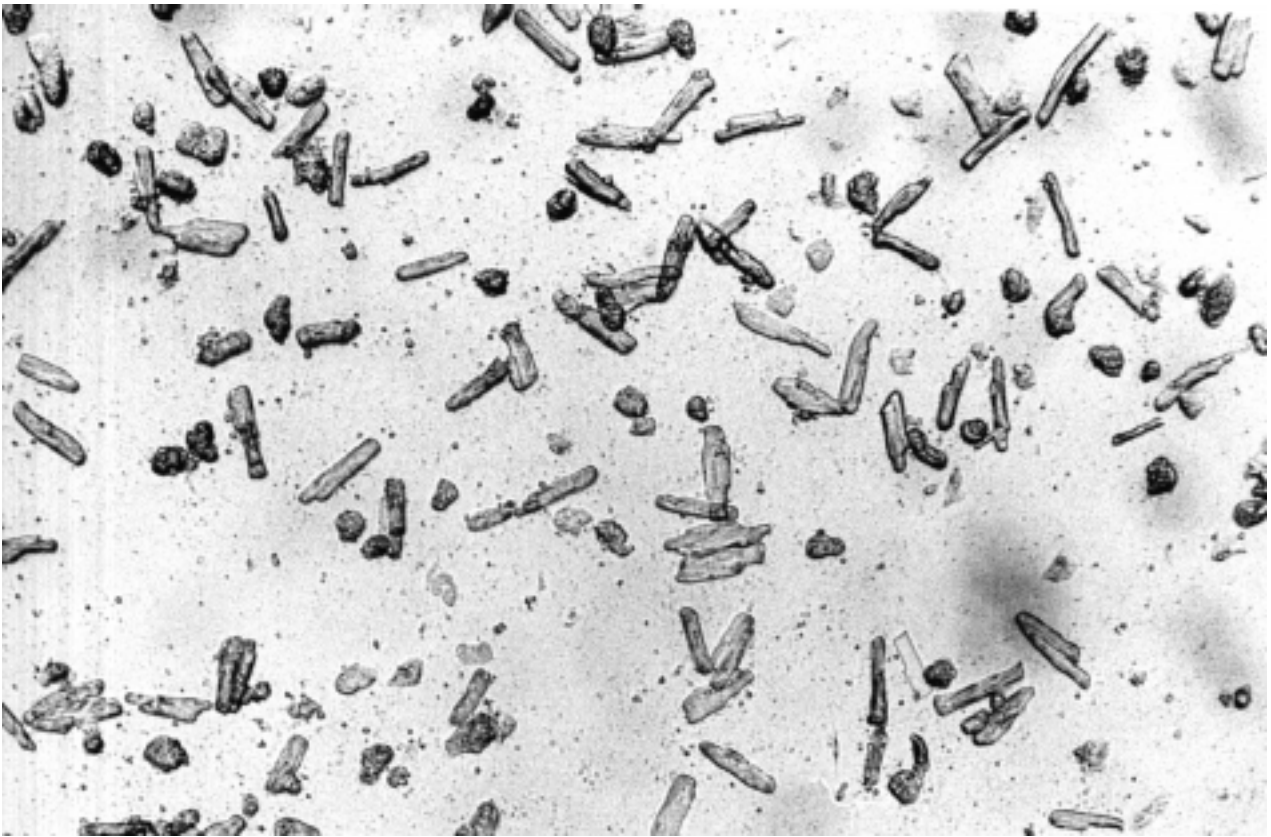


Abb. 24: Zellkultur normoxischer Myozyten mit aktivierten Neutrophilen in der Co-Kultur nach 24h, Nativpräparat ohne Färbung in 100facher Vergrößerung

Abbildung 24 zeigt die Co-Kultur von normoxischen Myozyten und aktivierten PMN nach 24 h. Viele der normoxischen Myozyten konnten die „rod-shaped“-Form bewahren. Es läßt sich eine zunehmende Kontraktion der Kardiomyozyten in der Kultur beobachten. Weniger als 10% der Zellen sind während der 24h Inkubation abgestorben (Trypanblau wird von diesen Zellen aufgenommen).

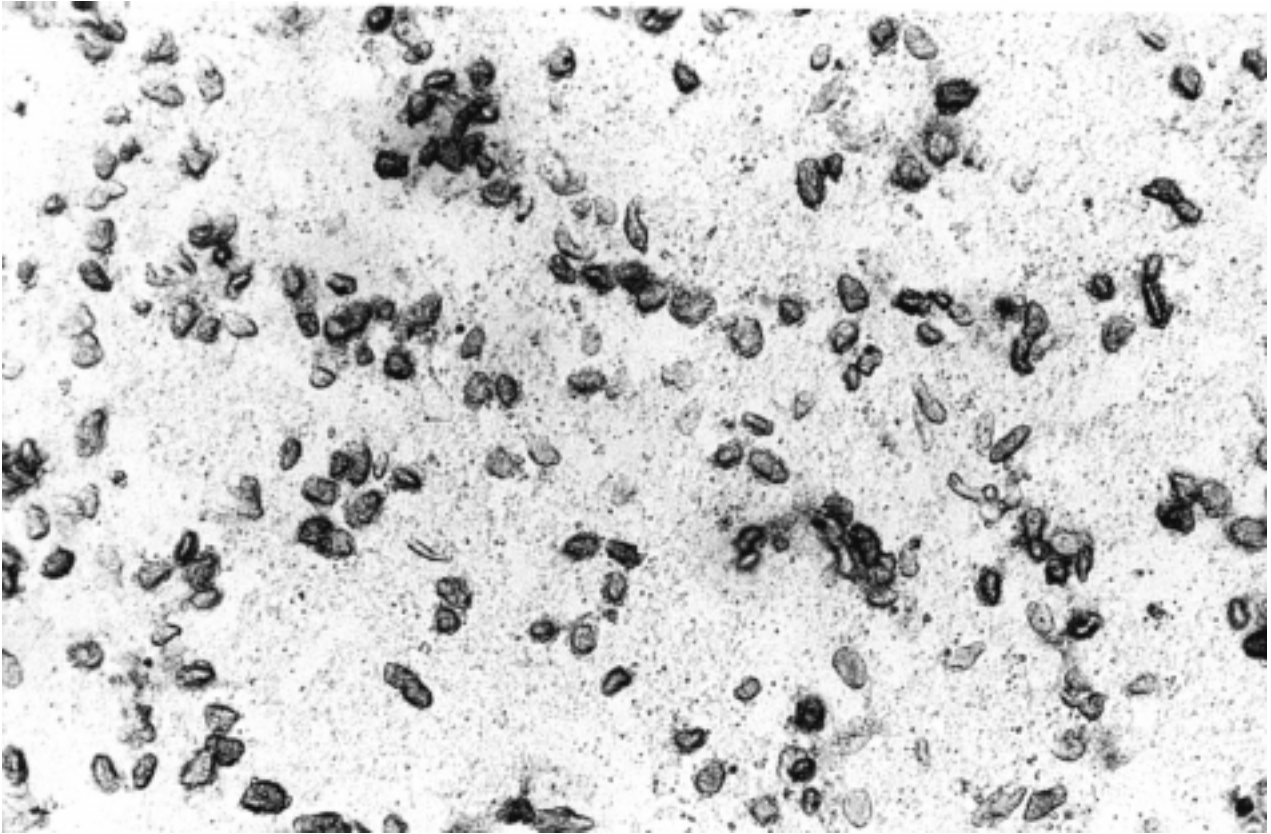


Abb. 25: Zellkultur anoxischer Myozyten mit aktivierten Neutrophilen in der Co-Kultur nach 24h, Nativpräparat ohne Färbung mit 100facher Vergrößerung

Die Abbildung 24 zeigt anoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 24h. Der Großteil der Zellen (70-95%) ist während der ersten 12h der Co-Inkubation abgestorben. Die Zellgrenzen der Myozyten erscheinen etwas unscharf, was auf eine beginnende Autolyse der Zellen hinweist. In diesem Beispiel einer Co-Kultur sind die anoxischen Myozyten überwiegend in abgerundetem Zustand abgestorben, sie können aber auch in stabförmigen Zustand absterben, was auf den noch folgenden Abbildungen zu beobachten ist (Abb. 29-30).

4.2.1. Radikal - „scavenger“ verbessern die Überlebenschancen von anoxischen Myozyten in der Co-Kultur mit aktivierten PMN

Durch den Zusatz von Radikal-„scavengern“ (hier am Beispiel SOD) soll versucht werden, das Überleben von anoxischen Myozyten in der Co-Kultur mit fMLP aktivierten PMN zu verbessern. SOD wird in einer Konzentration von 10 U/ml der Kultur von aktivierten PMN und anoxischen Myozyten zugesetzt und mit der Kontrollkultur verglichen. Als Kontrolle dient die Co-Kultur mit anoxischen Myozyten ohne SOD. Die folgenden lichtmikroskopischen Photographien belegen den positiven Einfluß von SOD auf das Überleben der anoxischen Myozyten in der Co-Kultur mit aktivierten Neutrophilen.

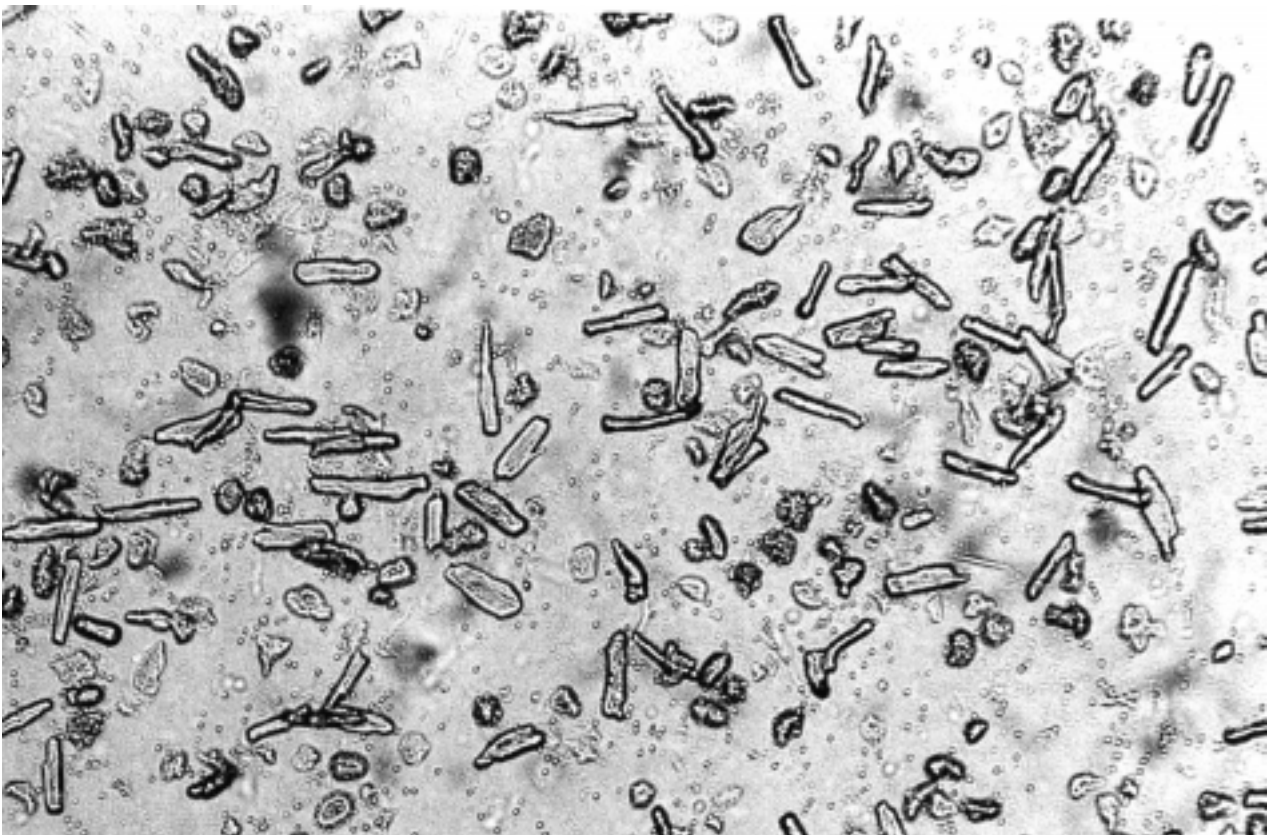


Abb. 26: Zellkultur anoxischer Myozyten in Co-Kultur mit aktivierten Neutrophilen und in Anwesenheit von 10 U/ml SOD nach einer Stunde, Nativpräparat ohne Färbung in 100facher Vergrößerung

Die Abbildung 26 zeigt eine Co-Kultur von 12h anoxischen Myozyten mit aktivierten PMN nach einer Stunde. Hierbei fällt auf, daß die anoxischen Myozyten größtenteils ihre „rod-shaped“-Form behalten. Nicht nur in der Morphologie unter dem Lichtmikroskop, sondern auch in der Vitalitätsprüfung mit Trypanblau nähert sich

das Ergebnis mit SOD in der Co-Kultur, dem der normoxischen Myozyten an, d.h. viel weniger Zellen sterben nach der Co-Inkubation mit aktivierten Neutrophilen ab. Bei den ausgeführten Experimenten werden die Substanzen (Radikalfänger, Adenosinabkömmlinge etc.) gleichzeitig mit den aktivierten PMN auf die Kulturschale gebracht analog den Biolumineszenz-Experimenten.

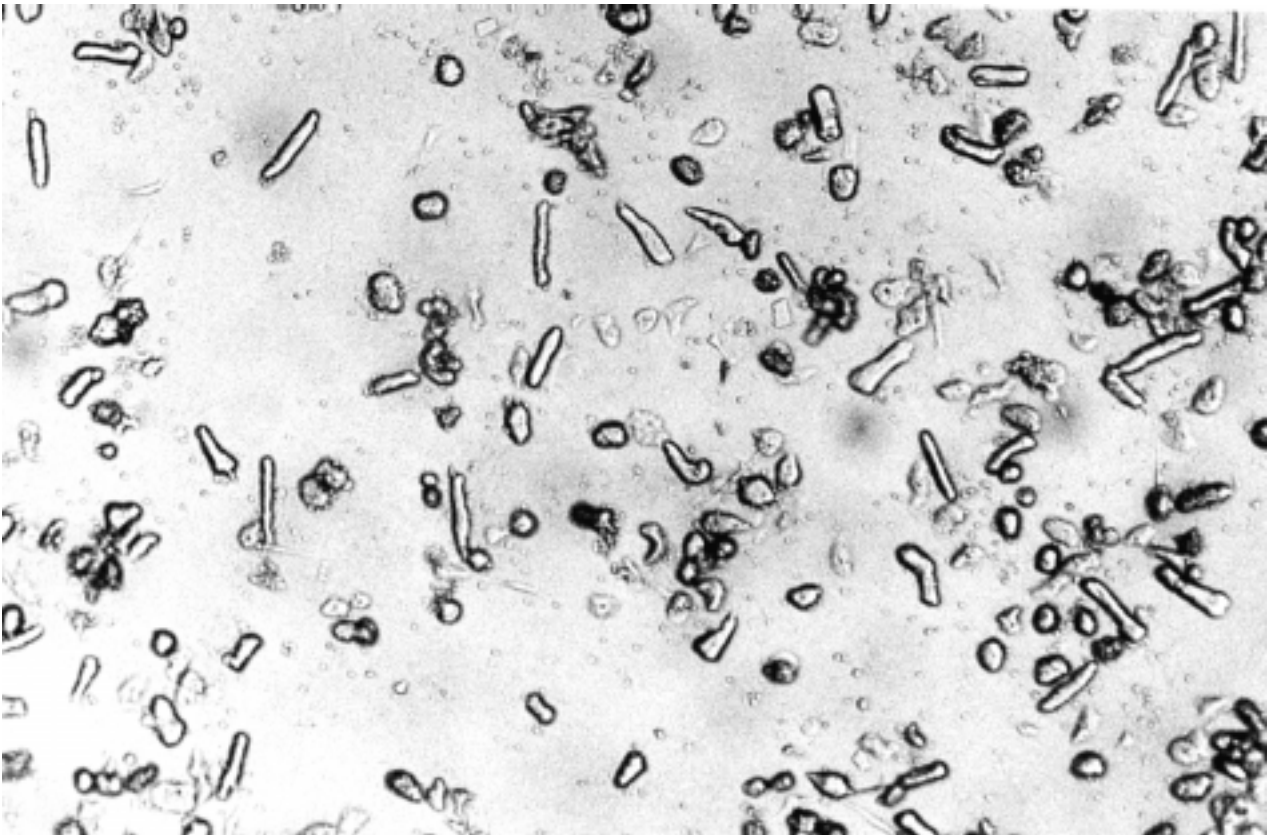


Abb. 27: Die Co-Kultur von anoxischen Myozyten mit Zusatz von 10 U/ml SOD nach 24h, Nativpräparat ohne Färbung in 100facher Vergrößerung

Nach 24 Stunden wird der positive Effekt von SOD in der Co-Kultur von anoxischen Myozyten und aktivierten PMN noch deutlicher. Während in der Vergleichskultur (AMy und aktivierte PMN) nahezu alle der kultivierten Herzmuskelzellen abgestorben sind, finden sich in der Kultur mit Zusatz von 10 U SOD nach 24 Stunden deutlich mehr vitale Kardiomyozyten (30-65% mehr vitale Myozyten). Die abgebildeten Kardiomyozyten (Abb. 27) zeigen eine beginnende „Entdifferenzierung“, wobei das Phänomen des Zell-„spreadings“ deutlicher zu beobachten ist, verglichen mit der Kultur von normoxischen Myozyten. Vergleichbare positive Effekte ergeben die Radikal-„scavenger“ Katalase und Glutathion-Peroxidase und einige Adenosin Agonisten. Hierbei erweisen sich die Substanzen, welche bereits im Biolumineszenzassay als sehr positiv aufgefallen waren (SOD>Katalase>GP, Adenosin>NECA>PIA>CPA), als besonders potent. Die Ergebnisse des Biolumineszenzassays korrelieren mit den Beobachtungen der Myozytenkulturen.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 28-30) von mit Trypanblau angefärbten Kulturen machen nochmals den positiven Einfluß der Radikalfänger (hier am Beispiel SOD) deutlich. Die PMN-Inkubation ist auf den dargestellten Photos eine Stunde lang erfolgt. Zu bemerken ist, daß besonders in der Kultur von anoxischen Myozyten mit aktivierten PMN annähernd stabförmige (hyperkontrahierte) Zellen vorhanden sind, die den Farbstoff Trypanblau aufnehmen. Das Vorkommen dieser Zellen vor allem in der Kultur von 12h anoxischen Myozyten, kann darauf hinweisen, daß die 12h der Anoxie ausgesetzten Myozyten nicht mehr in der Lage waren, auf den zusätzlich zu der Anoxie auftretenden Stressor, nämlich die attackierenden Neutrophilen aktiv reagieren zu können. Die durch die Anoxie vorgeschädigten Zellen sterben ab, es findet keine aktive Formveränderung statt, die „Entdifferenzierung“ unterbleibt. Durch 10U SOD zur Co-Kultur wird der attackierende Einfluß der gebildeten Sauerstoffradikale vermindert, das zeigt sich deutlich am Zustand der Myozyten in der Kultur, der Anteil der vitalen Zellen steigt (wie der Vergleich der folgenden Abbildungen 28-30), werden 10U SOD zugesetzt.

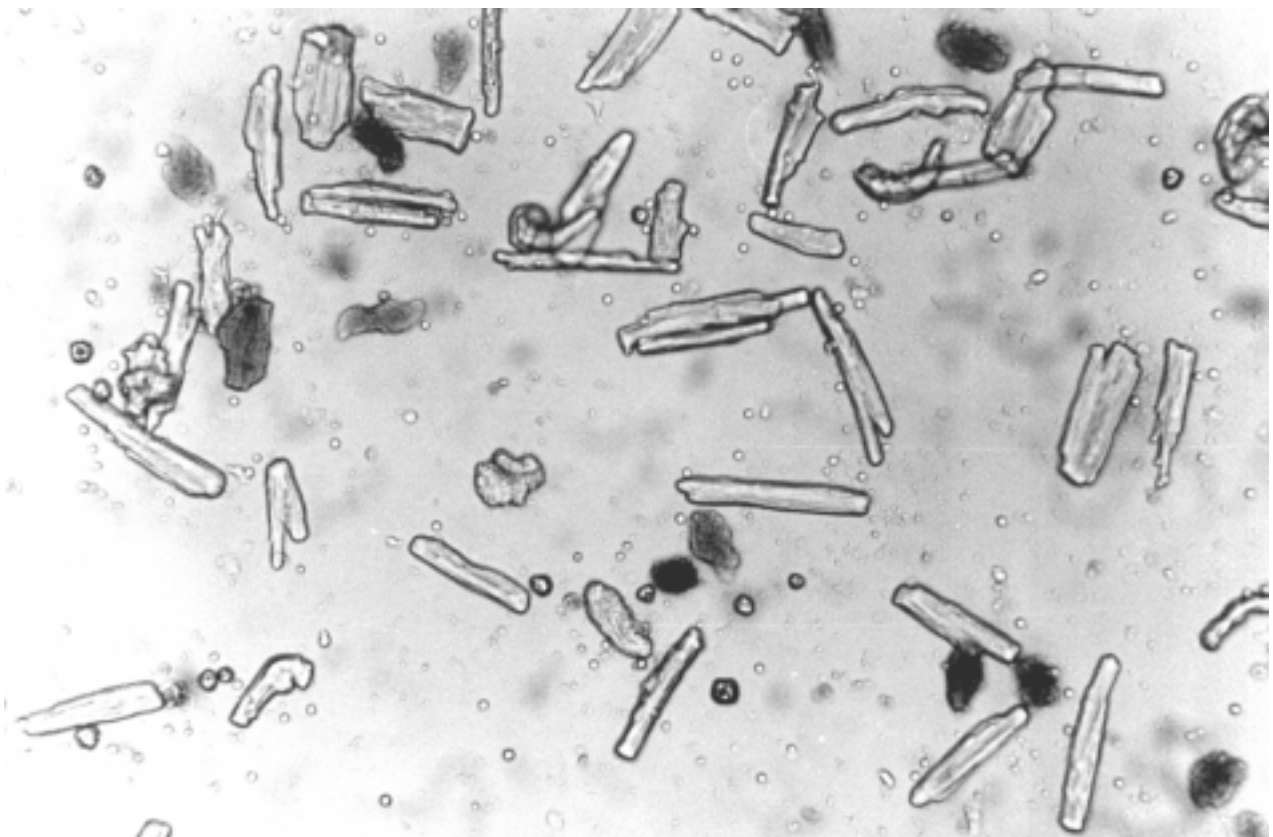


Abb. 28: Zellkultur normoxischer Myozyten mit aktivierten PMN nach 1h, Trypanblau-Färbung, 150fache Vergrößerung

Abb. 29: Zellkultur 12h anoxischer Myozyten mit aktivierten PMN nach 1h, mit Trypanblau-Färbung, 150facher Vergrößerung

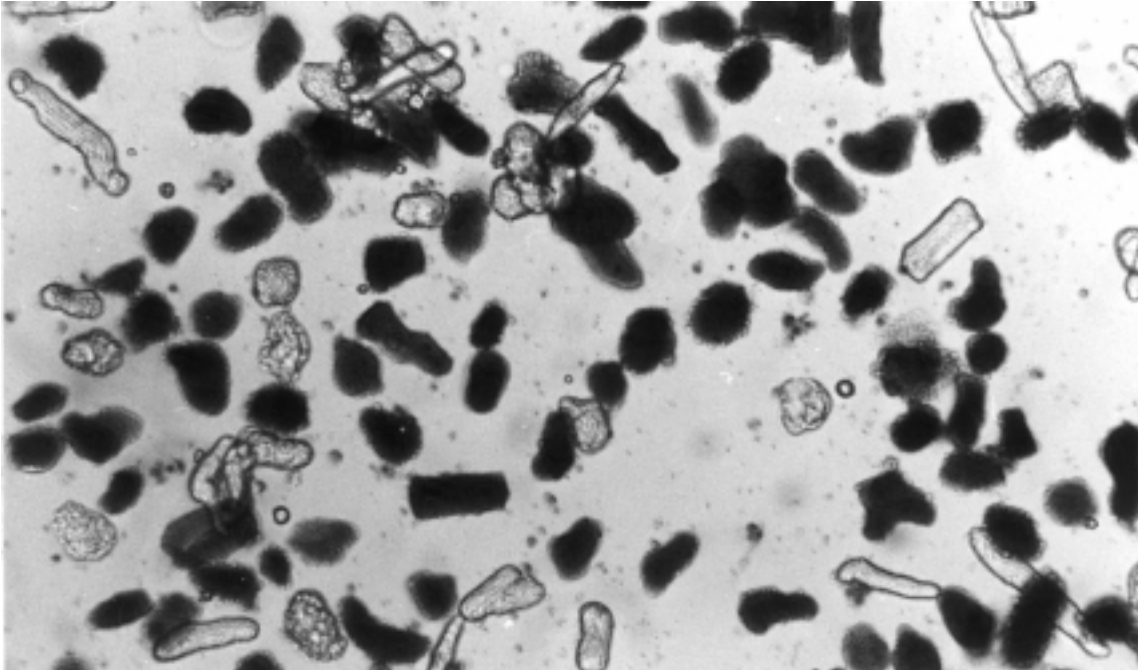
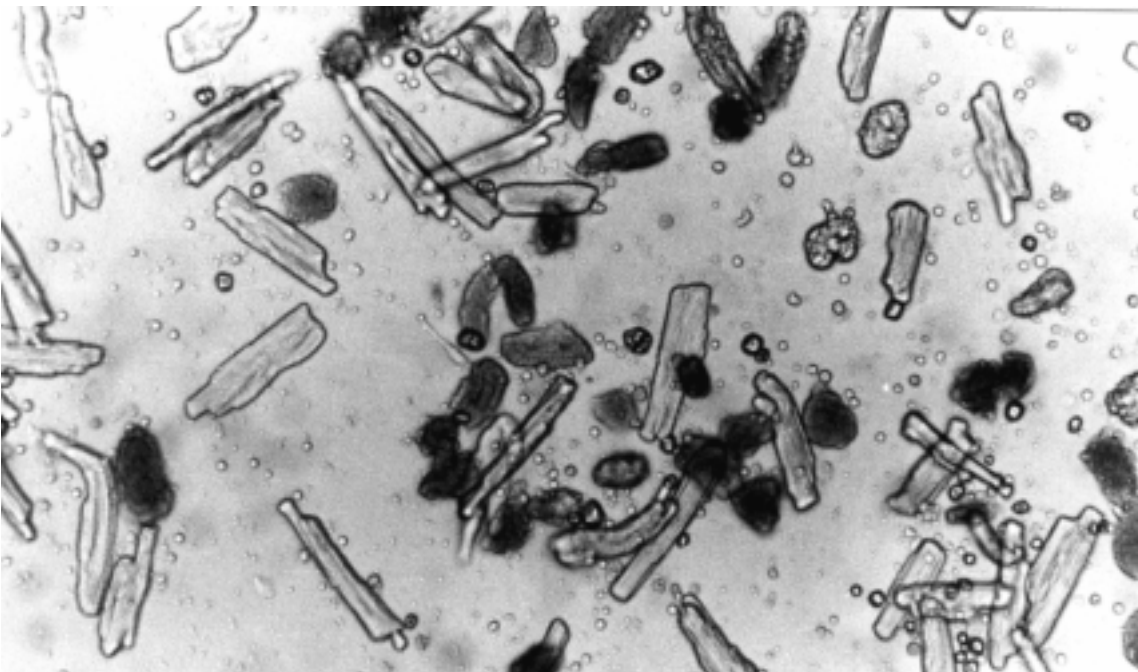


Abb. 30: Zellkultur 12h anoxischer Myozyten mit aktivierten PMN und 10U SOD nach 1h, mit Trypanblau-Färbung, 150facher Vergrößerung

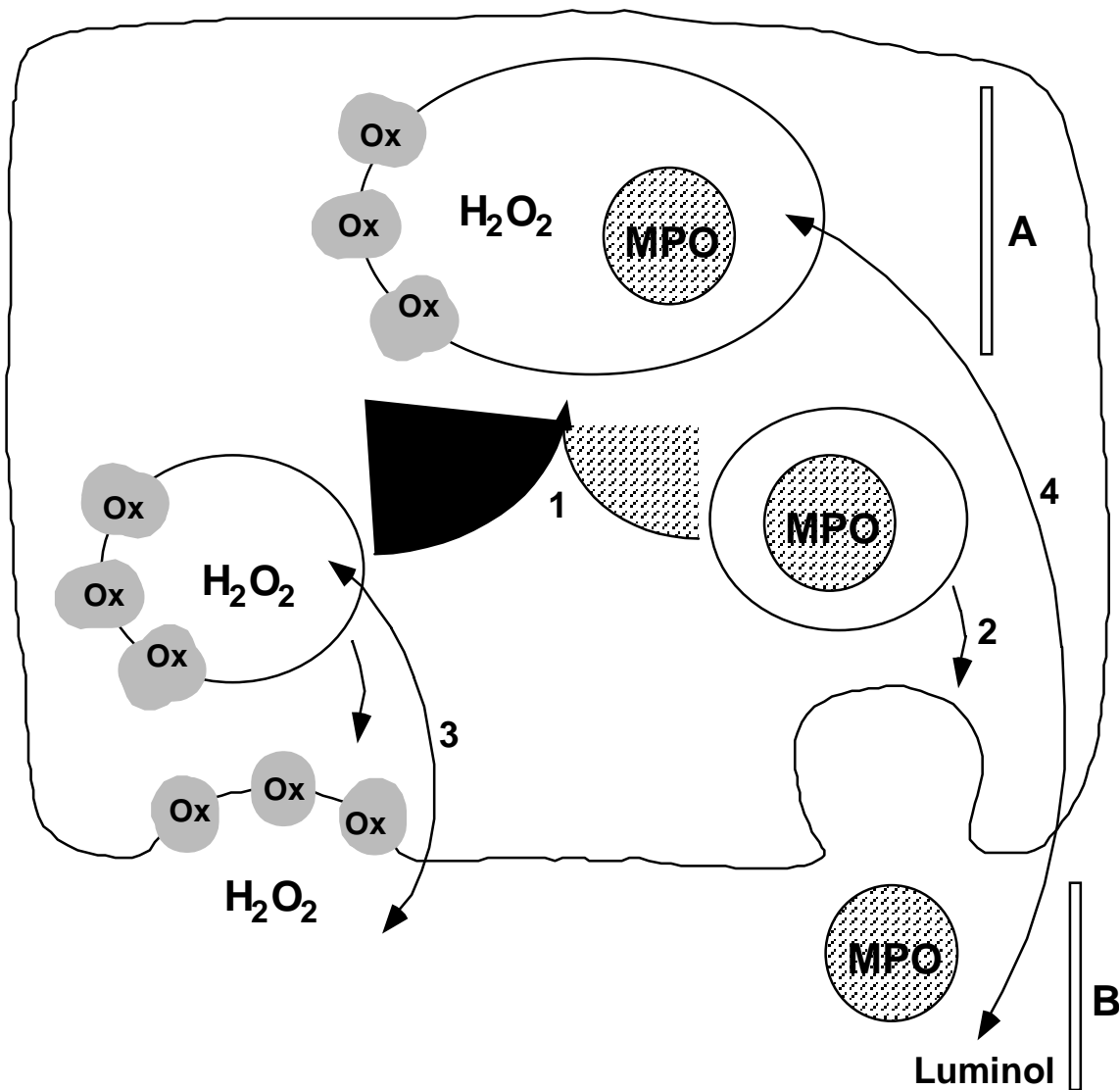


5. Diskussion

5.1. Auswahl der Methoden

Mit der nach *Piper* beschriebenen Methode der Isolierung und Kultivierung von Myozyten erhält man eine reine Myozytenkultur nach dem „Rapid-Attachment-Modell“ (*Piper 1990* und *Quaife 1991*). Die Isolierung der PMN mit der beschriebenen Methode gelingt, so daß eine Aktivierung der PMN während der Isolation vermieden werden kann. Die Reinheit der isolierten PMN-Fraktion ist, wie auch schon in der Arbeit von *Z. Szalay* beschrieben, mit über 90% gut. Die Zellkultur als Co-Kultur von aktivierten PMN und Myozyten liefert zusätzliche Hinweise auf die ablaufenden Zell-Interaktionen mit einem ganzheitlichen Aspekt der Betrachtung.

Die Luminol vermittelte Biolumineszenzmessung zur Detektion des „oxidative burst“ mit fMLP aktivierten PMN ist eine sensitive Methode zur Erfassung von gebildeten H_2O_2 -Sauerstoffradikalen. Um die Wechselwirkungen zwischen aktivierten PMN und Myozyten in Anwesenheit verschiedener Substanzen zu beurteilen, eignet sich die Analyse des „respiratory burst“ der Neutrophilen im Biolumineszenzassay. Die Aktivierung der Neutrophilen durch fMLP ist hinreichend untersucht, und es läßt sich im Auto-Lumat LB 953 ein reproduzierbares Lichtsignal durch die Vermittlung des Verstärkers Luminol erzeugen, das der Produktion von H_2O_2 durch die zelluläre NADPH-Oxidase entspricht. Die Reaktion aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten kann durch die kinetische Messung aufgezeigt werden, andere gleichzeitig ablaufende Reaktionen (wie Degranulation von spezifischen und unspezifischen Granula, Interaktionen auf Rezeptorebene, Phagozytosebereitschaft und Produktion von anderen Radikalspezies wie OH^- und Cl-Verbindungen durch die Myeloperoxidase) bleiben bei dieser Methode der Betrachtung der Interaktion im Hintergrund. Diese eventuell parallel ablaufenden Prozesse sind aber nicht zu vernachlässigen, und es ist anzunehmen, daß sie das Überleben von Myozyten in der Co-Kultur mit aktivierten PMN gleichfalls mitbeeinflussen. Als unmittelbares Produkt der NADPH-Oxidase (durch z.B. fMLP) entsteht ein Superoxid Anion (O_2^-), als Folge von sekundären Reaktionen werden die Sauerstoffradikale Hydrogen Peroxid (H_2O_2), hydroxyl Radikale ($\cdot\text{OH}$) und O_2 gebildet. Luminol detektiert hauptsächlich H_2O_2 im Assay, inwieweit andere Sauerstoffradikalspezies den „burst“ beeinflussen ist noch unklar. Das H_2O_2 , welches in der Luminol- vermittelten Biolumineszenzmessung detektiert wird, entsteht durch spontane Dismutation aus O_2^- als Präkursor. Die Aktivierung der Oxidase führt zur Abgabe von H_2O_2 in intrazelluläre Kompartimente oder in den Extrazellulärraum, je nachdem, ob sich die aktivierte Oxidase im Membransystem, der Zellmembran oder in der Membran von intrazellulären Vesikeln befindet. Das folgende Schaubild (Abb. 31) macht den Mechanismus der Detektion der H_2O_2 -Radikale im Biolumineszenzassay mit fMLP und Luminol deutlich.



Mechanismus der (A = intrazellulär, B = extrazellulär) stattfindenden Luminol-vermittelten Chemilumineszenz in den PMN

Ox = NADPH-Oxidase (aktiviert)

MPO = Myeloperoxidase

1. Fusion von spezifischen (NADPH-Oxidase enthaltenden) und azurophilen (MPO enthaltenden) Granula
2. Exozytose von Myeloperoxidase (MPO)
3. Diffusion von H₂O₂ durch biologische Membrane
4. Diffusion von Luminol durch Membransysteme

Abb. 31: Die durch die Bilumineszenz sichtbar gemachten H₂O₂-Radikale und der Mechanismus ihrer Entstehung

H₂O₂ kann frei die Membranen passieren und so durch Diffusion die Kompartimente wechseln. Auch Luminol kann durch Diffusion beide Kompartimente erreichen und so im Biolumineszenzassay die Sauerstoffradikale sowohl intra- wie extrazellulär sichtbar machen (*Root et al. 1975*). Um allerdings intrazellulär die Chemilumineszenz, vermittelt durch Luminol zu triggern, bedarf es aller Wahrscheinlichkeit nach der Fusion von spezifischen (Oxidase enthaltenden) und azurophilen (Myeloperoxidase enthaltenden) Granula (*Albrecht et al. 1993*). Zur Detektion von H₂O₂ durch Luminol ist ebenfalls die Anwesenheit von Myeloperoxidase (MPO) auch im Extrazellulärraum zur Chemilumineszenz nötig. Die strenge Abhängigkeit der Luminol vermittelten Chemilumineszenz (LCL) von der Myeloperoxidase zeigt sich bei der Untersuchung MPO-defizienter Zellen, die keine oder nur eine geringe LCL aufweisen (*Briheim et al. 1984, Dahlgren et al. 1982 und 1987*). Die Myeloperoxidase ist ein großes Molekül, so daß es nur durch Exozytose der azurophilen Granula in den Extrazellulärraum gelangen kann. Bei durch fMLP aktivierten PMN kommt es sowohl zur intra- als auch zur extrazellulären Produktion von H₂O₂. Initial beobachtet man einen Anstieg innerhalb der ersten zwei Minuten, der das Resultat der extrazellulären Chemilumineszenz vermittelt von Luminol und getriggert vom MPO-H₂O₂-System darstellt. Ein zweiter Gipfel erscheint ca. zehn Minuten nach der fMLP-Zugabe und resultiert aus einer später stattfindenden Chemilumineszenzreaktion in intrazellulär gebildetem H₂O₂ (*Briheim et al. 1984*). In den bei den Experimenten ausgeführten Biolumineszenz-messungen wird nur der erste, rasch erscheinende Gipfel aufgezeichnet und beurteilt. *Wymann* standardisierte die Luminol-vermittelte Chemilumineszenz von fMLP aktivierten PMN mit der Kombination von extrazellulärer Peroxidase und Azid im Assay, um ausschließlich extrazellulär gebildetes H₂O₂ als Lichtsignal zu erfassen (*Wymann et al. 1987*). Azid ist in der Lage, die zelluläre MPO zu blockieren, so daß es zur Beeinträchtigung der globalen Chemilumineszenz kommt. Durch die Anwesenheit von extrazellulärer Peroxidase (HPO) werden Prozesse, welche die Detektion von extrazellulärem H₂O₂ in der Luminol vermittelten Chemilumineszenz zur Folge haben, wieder möglich. Die standardisierte Methode mit 10 U HPO und Azide (0.1 mM) im Assay mit fMLP aktivierten PMN erfaßt also selektiv extrazellulär gebildetes H₂O₂ als Produkt der aktivierten NADPH-Oxidase der aktivierten PMN.

5.2. Interpretation und Kritik der Ergebnisse

fMLP wird in den Experimenten als Stimulus im Assay mit PMN und anoxischen Myozyten eingesetzt. Die Wirkungen von fMLP, die zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führen, wurden bereits in 1.2. dargestellt. Eine zusätzliche aktivierende Wirkung (in der Abb. 32 nicht aufgezeigt) geht von den im Assay anwesenden anoxischen Myozyten aus, wie es die Ergebnisse unter 4.1.2. zeigen. In den Versuchen von Z. Szalay zur Interaktion von PMN und anoxischen Myozyten zeigt sich dieser stimulierende Effekt als „zellgebunden“, d.h. es keine aktivierende Wirkung des anoxischen Inkubates, etwa durch einen von den Myozyten während der Anoxie oder während der Reperfusions- bzw. Reoxygenierungsperiode in das Medium abgegebenen löslichen Faktor nachgewiesen werden (Z. Szalay 1997). Über welchen Mechanismus die Aktivierung der PMN durch anoxische Myozyten geschieht, ist noch unklar, aber vermutlich ist diese Beobachtung durch eine (möglicherweise relativ unspezifische) Veränderung der Oberflächenrezeptoren der Myozyten (Z. Szalay 1997: Experimente mit Membranfraktionen und mit Neuraminidase vorbehandelten Myozyten) während der Anoxie und durch eine Beeinträchtigung des zellulären Schutzsystems gegenüber gebildeten Radikalen (Z. Szalay 1997: Ergebnisse mit SOD-Inhibitor präinkubierten Myozyten) erklärbar.

Der (gesteigerte) „oxidative burst“ der fMLP aktivierten neutrophilen Granulozyten in Anwesenheit von anoxischen Myozyten wird nun durch die Zugabe von verschiedenen Pharmaka aus unterschiedlichen Substanzgruppen modifiziert. Die folgende schematische Abbildung verdeutlicht die möglichen Wirkungsweisen der verschiedenen Pharmaka, die zur Veränderung des „oxidative burst“ der fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten führen.

Die Wirkung der eingesetzten Pharmaka auf das Myozytensystem werden in der nachfolgenden Darstellung in Abbildung 32 außer acht gelassen und nur die Wirkungen auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase der PMN beleuchtet. Es ist aber vorstellbar, daß gerade Pharmaka aus der Gruppe der Kalziumantagonisten, adrenerge Substanzen und Adenosin-Abkömmlinge einen nicht zu vernachlässigenden Effekt auf den Zustand der Myozyten nach der Anoxieperiode haben. So dürfte ein Teil der positiven Wirkung der verwendeten Substanzen auch auf die direkte Beeinflussung der anoxischen Myozyten zurückgeführt werden. Während der kinetischen Messung ist zwar die Inkubationszeit relativ kurz, aber eine Wirkung dennoch denkbar. Ein so pharmakologisch unterstützter Myozyt aktiviert die neutrophilen Granulozyten vielleicht nicht in dem Maße, ist andererseits besser vor den attackierenden Sauerstoffprodukten geschützt, was sich z.B. in einem besseren Überleben in der Co-Kultur mit aktivierten PMN zeigt. Auf der anderen Seite fällt der „oxidative burst“ der aktivierten neutrophilen Granulozyten durch Modulation mit den verschiedenen Pharmaka geringer aus, wodurch die anoxischen Myozyten nicht mehr in dem Maße durch Sauerstoffradikale attackiert werden.

Um die Ergebnisse der kinetischen Messungen strukturierter zu veranschaulichen, soll das nachfolgende zusammenfassende Modell die Wirkungsweisen der zur Modulation des „oxidative burst“ eingesetzten Substanzen auf die aktivierten neutrophilen Granulozyten verdeutlichen (siehe Abb. 32).

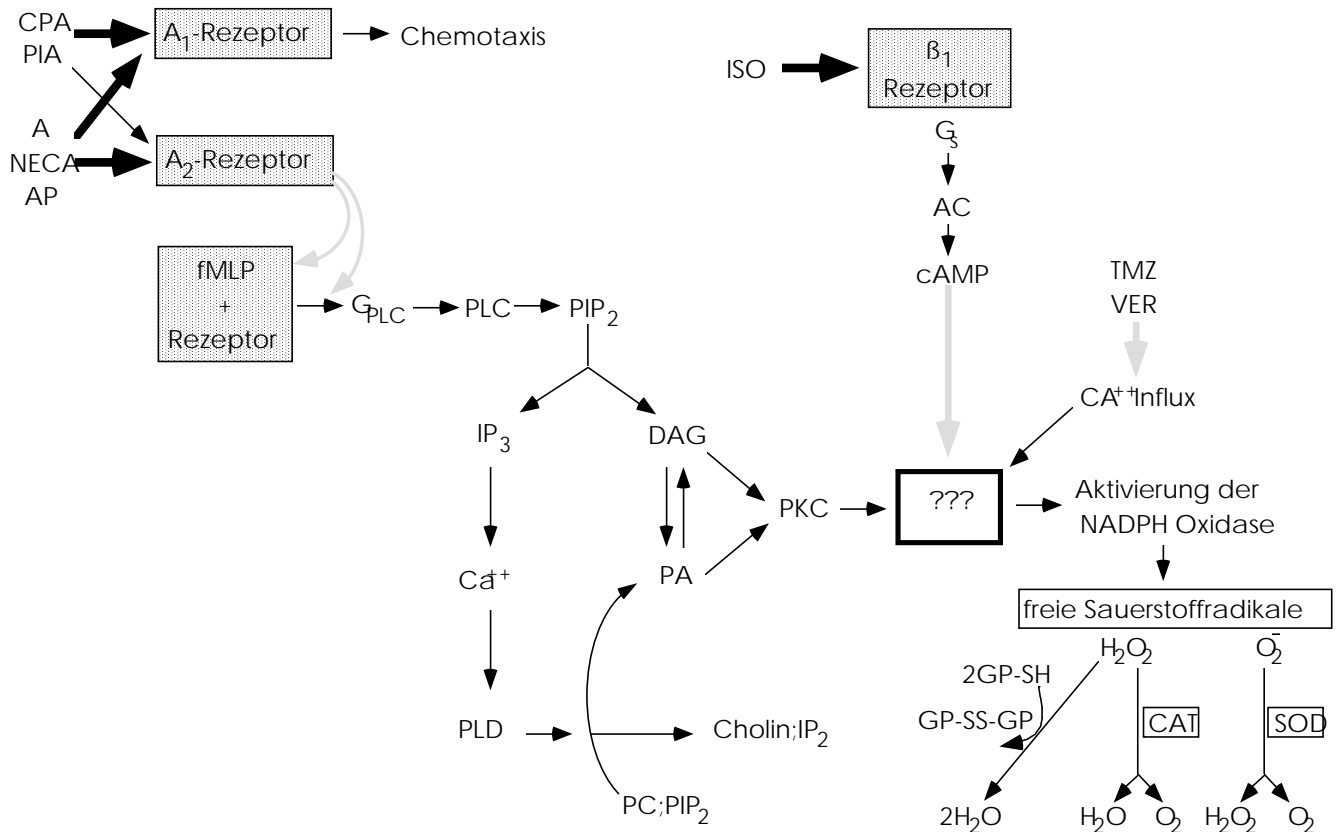


Abb. 32: Wirkungsmechanismus der unterschiedlichen eingesetzten Substanzen zur Modulation des „oxidative burst“ am PMN-System

Die Gruppe der Radikalfänger (SOD, Katalase und Glutathionperoxidase) greifen in ihrer Wirkung am Endprodukt des „oxidative burst“, den Sauerstoffradikalen an und gehen Verbindungen mit den reaktionsfähigen Sauerstoffprodukten ein, so daß die Radikalwirkung abgefangen werden kann. SOD fördert die Dismutation des primären Produktes der aktiven NADPH-Oxidase, des Superoxid Anions zu H₂O₂ und O₂. Glutathionperoxidase und Katalase fangen die Wirkungen von einer anderen Radikalspezies (nämlich H₂O₂, das durch sekundäre Prozesse aus Superoxid gebildet wird) ab. Die Wirkung von SOD im Biolumineszenzassay mit neutrophilen Granulozyten ist zunächst widersprüchlich (*Semb et al. 1989*), aus der auf Seite 3 (*Johnston et al. 1975*) angegebenen Reaktionsformel ist die reduzierende Wirkung auf das Signal der Luminol vermittelten Chemilumineszenz (LCL) nicht zu erklären. Sogar würde man nach der oben beschriebenen Reaktion durch SOD im Assay eine

Erhöhung des Signals erwarten, da das Endprodukt H_2O_2 ist. Das Gegenteil ist aber tatsächlich der Fall: Durch SOD reduziert sich das Signal des „oxidative burst“ im Luminol vermittelten Chemilumineszenzassay signifikant, diese etwas widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der SOD-Wirkung beschreiben auch *Dahlgren 1987, Takahashi 1991* und *Gyllenhammar 1989* in ihren Abhandlungen. Die Wirkung von Superoxid-Dismutase ist hierbei vermutlich durch eine direkte Wirkung auf die MPO-abhängige LCL und durch eine Suppression des O_2^- vermittelten Peaks (siehe 4.1.: Fragliche Beeinflussung des „burst“ durch andere Sauerstoffradikale, z.B. O_2^-) insbesondere im Extrazellulärraum zu erklären (*DeChatelet et al. 1982*). Dieser Effekt ist unabhängig von der Fähigkeit von SOD zur Bildung von H_2O_2 aus O_2^- . SOD beeinflusst und hemmt besonders den fMLP-induzierten ersten (extrazellulären) Peak der LCL und hat weniger Effekt auf den zweiten, intrazellulär stattfindenden Peak (*Takahashi et al. 1991*). Die Wirkung von SOD auf den „oxidative burst“ der PMN im Assay ist erstaunlich und unabhängig von der Dismutaseaktivität, durch einen direkten Einfluß auf die Myeloperoxidase abhängige und Luminol vermittelte Chemilumineszenz zu erklären. *Kettle* und *Winterbourn* beschreiben in ihren Arbeiten einen direkten Einfluß von SOD auf die Myeloperoxidaseaktivität (*Kettle und Winterbourn, 1988, 1989 und 1990*). Die Wirkungen der unterschiedlichen Adenosin-Abkömmlinge auf A_1 - und A_2 -Rezeptoren auf der PMN-Oberfläche werden in dem Schaubild durch die unterschiedliche Dicke der Pfeile verdeutlicht. Adenosin und NECA sind Agonisten an A_1 - und A_2 -Rezeptoren, Aminophyllin (AP) der Antagonist an beiden Rezeptortypen und CPA und PIA zeigen eine größere Affinität als Agonisten zum A_1 -Rezeptor. Der A_1 -Rezeptor scheint eher die Funktion der Chemotaxis der Neutrophilen zu beeinflussen, während der A_2 -Rezeptor eine Wirkung auf den „oxidative burst“ hat (*Cronstein et al. 1990 und 1992*). Die Vorstellung, wie der besetzte Adenosin-Rezeptor den „burst“ fMLP aktivierter PMN zu beeinflussen vermag, ist in der Abbildung durch zwei inhibitorische Pfeile angedeutet, die früh in den „second-messenger“-Weg der fMLP-Wirkung eingreifen. Zum einen wird damit auf die „Desensibilisierung“ des fMLP-Rezeptor-Komplexes und zum anderen auf die Inhibition der Rezeptorwirkung auf das gekoppelte G-Protein verwiesen, die von *Cronstein* vermutet werden (*Cronstein et al. 1992*).

Zur Wirkungsweise von Verapamil (VER) wurde bereits die zentrale Bedeutung des Kalzium-Influx in den Stoffwechselvorgängen der neutrophilen Granulozyten. Die Vorstellung liegt nahe, daß durch Senkung der Kalziumkonzentration der „oxidative burst“ der aktivierten PMN zu beeinflussen ist (*Rosales et al. 1992*).

TMZ ist eine neuartige antianginöse Substanz mit unterschiedlichen kardioprotektiven Wirkungen (*Fabiani et al. 1992*). Im Energiemetabolismus der ischämischen Myozyten bewirkt Trimetazidin, daß ATP weiter als Energiefieferer bereitsteht (*Kay et al. 1995*), es beeinflusst die Kalziumregulation der Mitochondrien und begrenzt die Kalziumakkumulation in der ischämischen Zelle (*de Leiris et al. 1993*), desweiteren wirkt es stabilisierend auf die Zellmembran und eine Wirkung als Radikalfänger wird diskutiert (*Tsimoyiannis et al. 1993*).

Isoproterenol ist ein Agonist an β_1 -Rezeptoren und vermittelt die Wirkung über ein G-Protein, der eine Aktivierung der Adenylat Cyclase (AC) folgt. Der Anstieg des von der Adenylat Cyclase gebildeten cyclischen AMP korreliert mit einem inhibitorischen Effekt auf die NADPH-Oxidase-Aktivität.

Der Proteinkinase C - Inhibitor Staurosporin erweist sich ebenfalls als eine wirksame Substanz, die freie Radikalproduktion fMLP aktivierter PMN deutlich zu reduzieren. Dieses Ergebnis betont die zentrale Rolle der Proteinkinase C im „second-messenger“-Weg, der zur Aktivierung der NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten führt (Nigam *et al.* 1992).

Wie das Schaubild (Abbildung 32) verdeutlicht, ist der „oxidative burst“ der aktivierten PMN durch verschiedene Pharmaka zu beeinflussen, die unterschiedliche Angriffspunkte haben. Im Biolumineszenzassay ergibt sich folgende zusammenfassende Darstellung:

Die Radikalfänger SOD, Katalase und Glutathionperoxidase eliminieren unterschiedliche Sauerstoffprodukte, wodurch ein additiver Effekt bei Einsatz von SOD und Katalase zu der Probe zu beobachten ist. Im Experiment zeigen SOD und Katalase eine ausgeprägte „scavenger“-Wirkung, und sie scheinen in der Fähigkeit den „oxidative burst“ fMLP aktivierter PMN zu reduzieren der Glutathionperoxidase etwas überlegen zu sein. Im Experiment reduzieren SOD und Katalase den H_2O_2 -burst auf 25 und 30%, während die Glutathionperoxidase in der Lage ist, die Radikalproduktion auf 52% herabzusetzen. In der Co-Kultur von fMLP aktivierten PMN und anoxischen Myozyten läßt sich der positive Einfluß von SOD für das Überleben der Myozyten im Vergleich zur Kontrolle (anoxische Myozyten und fMLP aktivierte PMN) entsprechend zeigen. Dieses Experiment kann man als zusätzlichen Hinweis werten, das die Interaktion von aktivierten PMN und Myozyten (speziell anoxischen Myozyten) wesentlich durch die gebildeten freien Sauerstoffradikale bestimmt wird. Fängt man die Radikale durch geeignete „scavenger“ ab, so folgt daraus ein besseres Überleben der anoxischen Myozyten, d.h. der hauptsächlich schädigende Faktor kann durch die Anwesenheit der „scavenger“ abgefangen werden. Andere zusätzlich schädigende Fähigkeiten der Neutrophilen wie z.B. Degranulation von proteolytischen Vesikeln scheinen in diesem experimentellen Aufbau (der Co-Kultur mit fMLP aktivierten PMN) eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Durch Zusatz von Radikalfängern zum fMLP-Assay kann also der „Schaden“, der den Myozyten während und nach der Anoxie zugeführt wird, herabgesetzt werden. Die wesentliche Schädigung während der Anoxie beruht wahrscheinlich auf einer Beeinträchtigung des zellulären Radikalfängersystems und auf einer Veränderung der Zelloberfläche, worauf schon Z. Szalay in seiner Arbeit hinweist (Z. Szalay 1997). Fügt man dem PMN-anoxische-Myozyten- Meßsystem nun wieder Radikalfänger hinzu, so kann der ursprünglich dramatisch angestiegene „oxidative burst“ deutlich und sicher abgeschwächt werden. Eine Abrundung der Ergebnisse bringen die Beobachtungen aus der Zellkultur, die ein längeres Überleben der mit SOD-behandelten Co-Kultur zeigt, welches schon beinahe mit dem Verhalten von normoxischen Myozyten in Anwesenheit von aktivierten PMN zu vergleichen ist.

Die Adenosin-Agonisten führen ebenfalls zu einer Reduktion der Radikalbildung fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten, wobei sich Adenosin selbst und die Agonisten an A₂-Rezeptoren als sehr potent erweisen, aber auch bei PIA (einem Agonisten an A₁-Rezeptoren) ist eine starke Wirkung nachzuweisen.

In der Messung der freien Radikale der aktivierten PMN läßt sich das Signal durch Isoproterenol um 50% reduzieren.

Auf die essentielle Rolle des Kalziums in den Stoffwechselprozessen speziell auch bei den polymorphkernigen Neutrophilen wurde schon mehrfach verwiesen. Über diesen Mechanismus wird die Wirkung von Kalziumkanal-Blockern (wie Verapamil) auf die Aktivität der NADPH-Oxidase erklärbar. Im Assay mit aktivierten PMN und anoxischen Myozyten bewirkt TMZ eine Reduktion der Radikalproduktion. Der „respiratory burst“ der PMN wird in Anwesenheit von TMZ um die Hälfte gebremst. Verwendet man TMZ und Verapamil im Assay läßt sich ein additiver Effekt feststellen. Der Angriffspunkt von TMZ ist nicht allein dem stabilisierenden Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration zuzuschreiben (*Hisatome et al. 1991*). Zusätzlich kommt eine Wirkung als Radikalfänger in Betracht. Während der Messung bleibt auch der positive kardioprotektive Effekt von TMZ auf die Myozyten nicht aus, der sich dann indirekt in einer verminderten Radikalausbeute im Assay bemerkbar machen kann, denn die Myozyten widerstehen den attackierenden Radikalen besser wenn man dem Assay TMZ zugibt.

Durch den Zusatz der unterschiedlichen Substanzen zum Biolumineszenzassay kann über verschiedene Wirkungsmechanismen der „oxidative burst“ fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten gebremst und somit die Sauerstoff-Radikalproduktion reduziert werden, somit verbessert sich auch der Zustand der Myozyten in Anwesenheit von aktivierten PMN, und es kommt zu einer längeren Überlebenszeit der anoxischen Myozyten in der Kokultur mit aktivierten PMN.

5.3. Zusammenfassung

Rattenmyozyten werden im Langendorffmodell durch Perfusion des Herzens mit Kollagenase isoliert und anschließend kultiviert. Die isolierten Myozyten werden zum einen unter normoxischen Bedingungen gehalten, während die andere Hälfte der Myozyten einer 12h-Anoxie ausgesetzt wird. Eine 90%reine PMN-Fraktion wird aus Rattenblut durch Auftrennung der Leukozyten im Dichtegradienten gewonnen. Durch fMLP werden die isolierten Neutrophilen aktiviert und der „oxidative burst“ im AutoLumat LB 953 als Biolumineszenzsignal detektiert. Das Signal, das der freien Sauerstoffradikalbildung aktivierter PMN entspricht, erhöht sich in Anwesenheit von anoxischen Myozyten. Durch Zusatz von verschiedenen Substanzen, wie z.B. dem Proteinkinase C - Inhibitor Staurosporin, den Radikalfängern (SOD, Katalase und Glutathionperoxidase), Kalziumantagonisten, Isoproterenol oder bestimmten Adenosin-Agonisten, kann der „oxidative burst“ fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten deutlich verringert werden. Auch in der Co-Kultur von anoxischen Myozyten mit aktivierten Neutrophilen zeigt sich eine positive Wirkung der Pharmaka (hier am Beispiel SOD) auf das Überleben der Myozyten.

6. Anhang

6.1. Material

6.1.1. Chemikalien und Material

Wistar Ratten 150 g und 250 g: *Süddeutsche Tierzuchtanstalt*, Stuttgart

Kollagenase „Worthington“ Typ CLS II: *Biochrom*, Berlin

Dispase (Grad1): *Boehringer*, Mannheim

CR-Laminin, ECGS: *Collaborative Research Incorporation*, Bedford, USA

L-Glutamin, myoklonales fötales Kälberserum, Medium 199 mit Hanks-Salz mit 0.35 mg/l NaHCO₃, Natrium-pyruvat, Nicht-essentielle Aminosäuren (Nicht-ess-AS, 100-fach), Penizillin/Streptomycin (Pen/Strept., 10 000 U/10 000 µg), MEM Vitaminlösung (100-fach): *Gibco*, Schottland

Adenin, Allopurinol, BSA (Bovine Serum Albumine = Rinderserumalbumin) Fraktion V (frei von Fettsäuren), Kreatin, fMLP (N-formyl Met-Leu-Phe), Diethyldithiocarbaminsäure, Gelatine, Harnsäure, Heparin-Natriumsalz, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES), Insulin, Isoproterenol, Luminol (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazinedion), Peroxidase (HPO) Typ I vom Pferd, Natriumpyruvat (Typ II), D-Ribose, Superoxid-dismutase (SOD), Taurin, Trypsin, Verapamil: *Sigma*, Deisenhofen

Dimethylsulfoxid (DMSO), Natriumazid: *Merck*, Darmstadt

Gas Pak Plus TM, Methylenblau-Indikatorstäbe: *Becton und Dickinson*, USA

Carbogen (95% O₂, 5% CO): *Messer*, Griesheim

Percoll: *Pharmacia*, Schweden

Trimetazidin (TMZ): Frankreich

Adenosin, Aminophyllin (AP), N6-Cyclopentyladenosin (CPA),
5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin (NECA), R (-) N6-(2-Phenylisopropyl)adenosin (PIA):
Research Biochemicals Incorporated (RBI)

Nylonnetze (200 µm Maschenweite): *ZBF, Rüslikon, Schweiz*

Sterifilter (Sterifex GV 0.22 µm): *Millipore, Frankreich*

Kulturschalen (Falcon 3003, 78, 2 cm²), sterile Zentrifugenröhrchen (Blue Max 50 ml,
Falcon 2070, 15 ml): *Becton und Dickinson, Lincoln Park, USA*

Trypanblau: *Biochrom, Berlin*

Einmal-Zellschaber, sterile Einmalpipetten, 1, 2, 5, 10, 25 ml: *Costar, USA*

Autolumat LB 953: *Berthold, Wildbad*

Meßröhrchen, 5 ml (75 x 12 mm Durchmesser): *Sarstedt*

Einmalspritzen (20 und 2 ml): *Braun, Melsungen*

Alle übrigen Chemikalien sind von höchstem Reinheitsgrad und werden von den
Firmen *Merck, Darmstadt*, und *Sigma, Deisenhofen*, bezogen.

6.1.2. Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer werden bereitete und anschließend steril filtriert.

6.1.2.1 Lösungen und Puffer zur Myozytenisolation

Kollagenase Lösung:

40 ml KHM mit 0.012% w/v Trypsin, 0.012% w/v Dispase, 200 U/ml Kollagenase Typ D und BSA bis zu einem Gesamtproteingehalt von 0.27% w/v, 20 µl CaCl₂ (50 mmol).

Laminin-Lösung:

10 µg Laminin pro 1 ml Medium 199, aliquotiert und bei -20 Grad Celsius eingefroren. Die Kulturschalen werden vor der Zellkultivierung der Myozyten mit Laminin 25 µg/ml Medium 199 beschichtet und für 2h im Brutschrank bei 37 Grad Celsius inkubiert.

HEPES-Lösung (20-fach):

500 mM HEPES; 2 g Albumin in 100 ml Puffer (ph: 7.2).

EARL-Salz

siehe: *Piper 1990*

Krebs-Henseleit-Medium (KHM)

siehe: *Piper 1990*

Hepes Earlsalz-Lösung (HES)

siehe: *Piper 1990*

Percoll-Gradient 18 (90% Percoll):

| | |
|---------|-----------|
| 63.5 ml | Percoll |
| 3.5 ml | HEPES |
| 3.5 ml | EARL-Salz |

Percoll-Gradient M (Myozyten):

| | |
|---------|------------|
| 8.5 ml | Percoll 18 |
| 11.5 ml | HES |

Insulin:

1 mg/ml Insulin-Lösung wird mit 100 ml Medium 199 versetzt, aliquotiert und bei -20 Grad Celsius aufbewahrt.

iFKS (inaktiviertes fötales Kälberserum):

FKS wird im Wasserbad auf 37 Grad Celsius erwärmt und anschließend für 30 Minuten auf 56 Grad Celsius erhitzt, aliquotiert und bei -20 Grad Celsius gelagert.

Medium der Myozyten:

Das Medium 199 der Firma *Gibco* eignet sich zur Kultivierung adulter Kardiomyozyten, es ist eine Komposition aus anorganischen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und anderen Komponenten. Dem Medium wird zugesetzt:

a) Medium 199 ohne FKS

| | | |
|---------------|--------|-----------------------|
| Medium 199 | 190 ml | (1:50) |
| MEM Vitamine | 4 ml | |
| Insulin | 2 ml | (10 µg/ml) |
| Pen/Strept | 2 ml | (100 U bzw 100 µg/ml) |
| Nicht-ess.-AS | 2 ml | (1:100) |

b) Medium 199 mit 4% FKS:

| | | |
|---------------|--------|-----------------------|
| Medium 199 | 182 ml | (1:50) |
| IFKS | 8 ml | |
| MEM Vitamine | 4 ml | |
| Insulin | 2 ml | (10 µg/ml) |
| Pen/Strept | 2 ml | (100 U bzw 100 µg/ml) |
| Nicht-ess.-AS | 2 ml | (1:100) |

6.1.2.2. Lösungen und Puffer für die Isolation von Ratten PMN

Hanks-Puffer (siehe: *Wymann et al. 1987*) wird während der Isolation von neutrophilen Granulozyten in mehreren Isolationsschritten verwendet und ist auch als Puffer während der Biolumineszenzmessung geeignet.

Percoll-Dichtegradient:

| | Dichtegrad | H ₂ O (ml) | NaCl (1.5M) | Percoll (ml) |
|-----|------------|-----------------------|-------------|--------------|
| I | 1.052 | 22 | 4 ml | 14 |
| II | 1.063 | 18 | 4 ml | 18 |
| III | 1.075 | 15 | 4 ml | 21 |
| IV | 1.085 | 12 | 4 ml | 24 |
| V | 1.100 | 7 | 4 ml | 29 |

6.1.2.3. Lösungen zur Biolumineszenzmessung

Luminol-Lösung:

Die Endkonzentration im Meßröhrchen mit 1 ml Volumen beträgt 0.01 mM. Eine 0.1 mM Luminollösung wird mit Hanks-Puffer und 0.2% DMSO angesetzt und vor Licht geschützt.

6.1.2.4. Lösungen und Substanzen zur Aktivierung der PMN

fMLP, ein Peptid aus 3 Aminosäuren, ist in der Lage, Neutrophile zur Radikalproduktion anzuregen. Um eine optimale Detektion der gebildeten Sauerstoffradikale zu gewährleisten, wird im in-vitro-Modell Peroxidase und Natriumazid zugesetzt.

Für fMLP beträgt die Konzentration 0.1 µM in der Probe, fMLP ist in Phosphatpuffer (PBS) mit 0.2% DMSO gelöst.

Dem Assay wird 0.1 mM Natriumazid und 10 U „horseradish“ Peroxidase (HPO = Meerrettich-Peroxidase), beides gelöst, in Phosphatpuffer zugegeben.

6.1.2.5. Modulatoren der Neutrophilen-Funktion

a) Staurosporin:

Staurosporin ist ein Proteinkinase C - Inhibitor und lässt sich gut in PBS lösen. Die Proteinkinase C ist ein wichtiges Enzym in der Reaktionskette, die schließlich zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führt. Die im Assay verwendete Konzentration liegt bei 10^{-7} M.

b) Radikalfänger:

Radikalfänger sind in der Lage, reaktive Sauerstoffprodukte abzufangen, indem sie mit den Radikalen Verbindungen eingehen. Alle drei verwendeten Radikalfänger sind gut in PBS löslich, die verwendete Endkonzentration in der Probe beträgt jeweils 10 U.

b₁) Superoxid-Dismutase

b₂) Katalase

b₃) Glutathionperoxidase

c) Verapamil und Trimetazidin:

Die Endkonzentration der eingesetzten Substanzen beträgt 10^{-7} M und wird durch Verdünnung mit PBS erreicht. Verapamil ist ein Kalziumantagonist, Trimetazidin (TMZ) ist ein neues anti-ischämisch wirkendes Medikament mit noch nicht restlos erforschten Wirkungsweisen.

c₁) Verapamil

c₂) TMZ

d) Isoproterenol:

Isoproterenol gehört zur Gruppe der Katecholaminagonisten (speziell an β_1 -adrenergen Rezeptoren) und wird in einer Konzentration von 10^{-7} M verwendet.

e) Adenosin-Abkömmlinge:

Adenosin wirkt auf spezifische Adenosin-Rezeptoren auf der Zellmembran. Man unterscheidet zwei Typen von Adenosin-Rezeptoren, die A₁- und A₂-Rezeptoren, die auch auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten vorkommen. Die in-vitro Experimenten einsetzbaren Abkömmlinge des endogenen Adenosin unterscheiden sich in der Affinität von den beiden Rezeptortypen. Um die Löslichkeit der

verwendeten Substanzen in PBS zu verbessern, wird eine geringe Menge (0.2%) DMSO zugesetzt. Die Konzentration im Biolumineszenzassay beträgt dabei 10^{-7}M .

e₁) Adenosin Agonisten:

- Adenosin: Endogen, A₁- und A₂-Rezeptoragonist
- N6-Cyclopentyladenosin (CPA): A₁-Rezeptoragonist
- 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin (NECA): Agonist an A₁ und A₂
- R (-) N6-(2-Phenylisopropyl)adenosin (PIA): Agonist an A₁-Rezeptoren

e₂) Adenosin Antagonisten:

- Aminophyllin (AP): Antagonist an A₁ und A₂

6.2. Literatur

R. Allen

Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis

Methods in Enzymology, 133, 449-493, 1975

D. Albrecht, T. W. Jungi

Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes

J. of Leukocyte Biology, 54, 300-312, 1993

M. Baggiolini, F. Boulay, J.A. Badwey, J.T. Curnutte

Activation of neutrophil leukocytes: Chemoattractant receptors and respiratory burst

The FASEB Journal, 7, 1004-1010, 1993

C. Bengis-Garber, N. Gruener

Cross-talk between cAMP and formyl Met-Leu-Phe in human neutrophils: Phosphorylation of a 52,000 molecular weight protein

Cellular Signalling, 4, 247-260, 1991

G. Briheim, O. Stendahl, C. Dahlgren

Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes

Infection and Immunity, 45, 1-5, 1984

R. M. Clancy, I. Leszczynska-Piziak, S. B. Abramson

Nitric oxide, an endothelial cell relaxing factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH-Oxidase

J. Clin. Invest., 90, 1116-1121, 1992

R. A. Clark, K. G. Leidal, D. W. Pearson, W. M. Nauseef

NADPH-oxidase of human neutrophils

The Journal of Biological Chemistry, 262, 4065-4074, 1987

S. Cockcroft

G-protein-regulated phospholipases C, D and A₂-mediated signalling in neutrophils

Biochimica et Biophysica Acta, 1113, 135-160, 1992

B. N. Cronstein, L. Dagume, D. Nichols, A. J. Hutchison, M. Williams

The adenosine/neutrophil paradox resolved: Human neutrophils possess both A₁ and A₂ receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂⁻ generation, respectively

J. Clin. Invest., 85, 1150-1157, 1990

B. N. Cronstein, K. A. Haines, S. Kolasinski, J. Reibman

Occupancy of G_αs-linked receptors uncouples chemoattractant receptors from their stimulus-transduction mechanismus in the neutrophil

Blood, 80, 1052-7, 1992

B. N. Cronstein, R. I. Levin, J. Belanoff, G. Weissmann, R. Hirschhorn

Adenosine: An endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells

J. Clin. Invest., 78, 760-770, 1986

C. Dahlgren

Polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence induced by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine and phorbol myristate acetate: effects of catalase and superoxide dismutase

Agents-Actions, 21, 104-12, 1987

C. Dahlgren

Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes

Infection and Immunity, 736-741, 1983

L. R. DeChatelet, G.D. Long, P.S. Shiry, D.A. Bass, M.J. Thomas, F.W. Henderson, M.S. Cohen

Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils

The Journal of Immunology, 129, 1589-1593, 1982

B. Dewald, M. Baggiolini, J. T. Curnutte, B. M. Babior, 1979

Subcellular localization of the superoxide-forming enzyme in human neutrophils

J. Clin. Invest., 63, 21-29, 1979

J. G. R. Elferink, B. M. de Koster, G. J. J. C. Boonen, W. de Priester

Inhibition of neutrophil chemotaxis by purinoceptor agonists

Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie, 317, 93-106, 1992

R. L. Engler

Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion

The American Journal of Cardiology, 63, 19E-23E, 1989

D. English

Involvement of phosphatidic acid, phosphatidate phosphohydrolase, and inositide-specific phospholipase D in neutrophil stimulus-response pathways

J. Lab. Clin. Med., 120, 520-526, 1992

J. Fabiani, O. Ponzio, I. Emerit, S. Massonet-Castel, M. Paris, P. Chevalier, V. Jebara, A. Carpentier

Cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery graft surgery

Journal of Cardiovascular Surgery, 33, 486-91, 1992

R. Ferrari, C. Ceconi, S. Curello, O. Alfieri, O. Visioli

Myocardial damage during ischaemia and reperfusion

European Heart Journal, 14, 25-30, 1993

R. Ferrari

Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion

American Journal of Cardiology, 76, 17B-24B, 1995

J. T. Flaherty

Myocardial Injury mediated by oxygen free radicals

The American Journal of Medicine, 91, 79-88, 1991

H. Gyllenhammar

Mechanisms for luminol-augmented chemiluminescence from neutrophils induced by leukotriene B₄ and N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

Photochemistry and Photobiology, 49, 217-223, 1989

U. Hantke

Chemilumineszente organische Verbindungen

Mechanistische Vorstellungen zur Chemilumineszenzreaktion und mögliche Einflußgrößen auf die Chemilumineszenz dieser Verbindungen

Das Ärztliche Laboratorium, 32, 1-10, 1986

T. D. Henry, S. L. Archer, D. Nelson, E. K. Weir, A. H. L. From

Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion

Circulation Research, 67, 1453-1460, 1990

I. Hisatome, R. Ishiko, Y. Tanaka, H. Kosaka, J. Hasegawa, A. Yoshida, H. Kotake, H. Mashiba, M. Arita

Trimetazidine inhibits Na,K(+)-ATPase activity, and overdrive hyperpolarization in guinea-pig ventricular muscles

European Journal of Pharmacology, 195, 381-8, 1991

R. B. Johnston, B. B. Keele, H. P. Misra, J. E. Lehmeyer, L. S. Webb, R. L. Baehmer, K. V. Rajagopalan

The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity

J. Clin. Invest., 55, 1357-1372, 1975

L. Kay, C. Finelli, J. Aussedat, C. Guarniere, A. Rossi

Improvement of long-term preservation of the isolated arrested rat heart by trimetazidine: effects on the energy state and mitochondrial function

American Journal of Cardiology, 76, 45B-49B, 1995

A.J. Kettle and C.C. Winterbourn

Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid

Biochem. J., 252, 529-536, 1988

A.J. Kettle and C.C. Winterbourn

Influence of superoxide on myeloperoxidase kinetics measured with a hydrogen peroxide electrode

Biochem. J., 263, 823-828, 1989

A.J. Kettle and C.C. Winterbourn

Superoxide enhances hypochlorous acid production by stimulated human neutrophils

Biochemica et Biophysica Acta, 1052, 379-385, 1990

S.A. Kilfeather, M. Stein, K.O Malley

Neutrophil beta-adrenergic receptor responses are potentiated by acute exposure to phorbol ester without changes in receptor distribution or coupling

Life Sciences, 49, 713-720, 1991

J. de Leiris, F. Boucher

Rationale for trimetazidine administration in myocardial ischaemia-reperfusion syndrome

European Heart Journal, 14, 34-40, 1993

K. Mullane

Neutrophil and endothelial changes in reperfusion injury

Trends Cardiovasc. Med., 1, 282-289, 1991

S. Nigam, S. Müller, B. Walzog

Effect of staurosporine on fMet-Leu-Phe-stimulated human neutrophils: dissociated release of inositol 1,4,5-trisphosphate, diacylglycerol and intracellular calcium

Biochimica et Biophysica Acta, 1135, 301-308, 1992

L.H. Opie

Reperfusion Injury and its pharmacologic modification

Circulation, 80, 1049-1062, 1989

L.H. Opie

The mechanism of myocyte death in ischaemia

European Heart Journal, 14, 31-33, 1993

H. M. Piper

Cell culture techniques in heart and vessel research

Springer-Verlag, 1990

R. A. Quaife, Kohmotoo, W. Barry

Mechanismus of reoxygenation injury in cultured ventricular myocytes

Circulation, 83, 566-577, 1991

R. K. Root, J. Metcalf, N. Oshino, B. Chance, 1975

H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytoses

The Journal of Clinical Investigation, 55, 945-955, 1975

C. Rosales, E. J. Brown

Calcium channel blockers nifedipine and diltiazem inhibit Ca²⁺ release from intracellular stores in neutrophils

The Journal of biological Chemistry, 267, 1443-1448, 1992

Y. Sawa, S. Bernotat-Danielowski, B. Winkler, J. und W. Schaper

Do neutrophils play a role in killing myocytes reversibly injured by hypoxia?

J. Mol. Cell. Cardiol., 24, 3-25, 1990

J. Schaper, S. Hein, B. Speiser, R. Froede, N. Bleese

Ultrastructural changes, the cytoskeleton and the extracellular matrix in chronic ischemia

J. Mol. Cell. Cardiol., 24, 7-1, 1984

A. G. Semb, J. Vaage, O. D. Mjos

Oxygen free radical producing leukocytes cause functional depression of isolated rat hearts: Role of leukotrienes

J. Mol. Cell. Cardiol., 22 , 555-563, 1990

B. Siegmund, A. Koop, P. Schwartz, H. M. Piper

Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation

Am. J. Physiol., 258, H285- H291, 1990

T. Siminiak, T. Ozawa

Neutrophil mediated myocardial injury

International Journal of Biochemistry, 25, 147-56, 1993

J. E. Smolen

Neutrophil signal transduction: Calcium, kinases, and fusion

J. Lab. Clin. med., 120, 527-532, 1992

M. J. Steinbeck, A. U. Khan, M. J. Karnovsky

Interacellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap

The Journal of Biological Chemistry, 267, 13425-13433, 1992

Z. Szalay

Wechselwirkung von normoxischen und anoxischen Kardiomyozyten mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig Universität Giessen, 1997

R. Takahashi, K. Edashige, E. Sato, M. Inoue, T. Matsuno, K. Utsumi

Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils

Arch-Biochem-Biophys., 285, 325-30, 1991

E. E. Tsimoyiannis, J. J. Moutesidou, C. M. Moschos, M. Karayianni, S. Karkabounas, O. B. Kotoulas

Trimetazidine for prevention of hepatic injury induced by ischaemia and reperfusion in rats

European Journal of Surgery, 159, 89-93, 1993

P. A. Ward

Mechanismus of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils

The American Journal of Medicine, 91, 3C-89S, 1991

J. S. Woodhead

Chemiluminescence immunoassay

Journal of Clinical Immunoassay, 7, 82-89, 1984

M. P. Wymann, V. von Tscharner, D. A. Deranleau, M. Baggiolini

Chemiluminescence detection of H₂O₂ Produced by human neutrophils during the respiratory burst

Analytical Biochemistry, 165, 371-378, 1987

M. P. Wymann, V. von Tscharner, D. A. Deranleau, M. Baggiolini

The onset of the respiratory burst in human neutrophils

The Journal of Biological Chemistry, 262, 12048-12053, 1987

6.3. Abbildungsverzeichnis

| <u>Nummer</u> | <u>Bezeichnung</u> | <u>Seite</u> |
|---------------|---|--------------|
| 1 | Schema der Wirkungsweise von fMLP | 2 |
| 2 | Langendorff-Perfusionsapparatur | 12 |
| 3 | Kinetikgraph: 500 000 PMN durch fMLP aktiviert | 16 |
| 4 | Kinetikgraphik mit Zusatz von 2h und 12h anoxischen Myozyten zum fMLP- Assay mit PMN | 18 |
| 5 | Zusammenfassung der Effekte von 2h und 12h anoxischen Myozyten zum fMLP-Assay, in einem Histiogramm dargestellt | 19 |
| 6 | Der „respiratory burst“ von fMLP aktivierten PMN unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von Staurosporin | 21 |
| 7 | Vergleich der Biolumineszenzassays fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (Kontrollwert) und bei Zusatz von Staurosporin | 22 |
| 8 | Diagramm: Vergleich von fMLP aktivierten PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten (Kontrollwert) und Zusatz von SOD, GP und Katalase | 23 |
| 9 | Kinetik des „oxidative burst“ fMLP aktivierter PMN in Anwesenheit von anoxischen Myozyten und Zusatz von SOD zum Assay | 24 |
| 10 | Kinetik des fMLP Assay in Anwesenheit von anoxischen Myozyten bzw. Zusatz von Katalase zur Probe | 25 |
| 11 | Darstellung der additiven Wirkung von SOD und Katalase auf das Biolumineszenzsignal | 27 |
| 12 | Kinetikgraphik der Wirkung von Verapamil und TMZ im Assay mit fMLP aktivierte PMN und anoxischen Myozyten | 29 |
| 13 | Additiver Effekt im Experiment von Verapamil und TMZ als Zusatz um fMLP- Assay mit anoxischen Myozyten | 30 |
| 14 | Isoproterenol als Zusatz zum fMLP-Assay, dargestellt als Kinetikgraph | 31 |
| 15 | Histiogramm zur Veranschaulichung der Effekte von PIA, CPA, NECA und AP im Biolumineszenzassay mit fMLP aktivierten PMN und anoxischen Myozyten | 33 |
| 16a,16b | Chemotaxis von fMLP aktivierten Neutrophilen in der Kultur mit Myozyten innerhalb von 120 Minuten | 36 |
| 17a-d | Reaktion von Myozyten auf die Inkubation von aktivierten PMN (innerhalb von 180 Minuten) | 37 |

| <u>Nummer</u> | <u>Bezeichnung</u> | <u>Seite</u> |
|---------------|---|--------------|
| 18 | Zwei unterschiedliche morphologische Zustände der normoxischen Myozyten nach einer Inkubation von aktivierten PMN von 12h, Adhärenz der Neutrophilen an einem abgerundeten Myozyt | 41 |
| 19 | Zell-“spreading“ der Myozyten in der Langzeitkultur | 42 |
| 20 | Normoxische Myozyten | 43 |
| 21 | Anoxische Myozyten | 44 |
| 22 | Normoxische Myozyten mit PMN-Inkubation nach 1h | 45 |
| 23 | Anoxische Myozyten mit PMN-Inkubation nach 1h | 46 |
| 24 | Normoxische Myozyten mit aktivierten Neutrophilen in der Co-Kultur nach 24h | 47 |
| 25 | Anoxische Myozyten mit aktivierten Neutrophilen in der Co-Kultur nach 24h | 48 |
| 26 | Anoxische Myozyten in Co-Kultur mit aktivierten Neutrophilen nach einer Stunde | 49 |
| 27 | Die Co-Kultur von anoxischen Myozyten mit Zusatz von 10 U/ml SOD nach 24h | 50 |
| 28 | Normoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 1h (Trypanblau angefärbt) | 51 |
| 29 | 12h anoxische Myozyten mit aktivierten PMN nach 1h (Trypanblaufärbung) | 52 |
| 30 | 12h anoxische Myozyten mit aktivierten PMN und 10 U SOD nach 1h (Trypanblaufärbung) | 52 |
| 31 | Schaubild, der durch die Biolumineszenz sichtbar gemachten H ₂ O ₂ -Radikale und der Mechanismus ihrer Entstehung | 54 |
| 32 | Schaubild über den Wirkungsmechanismus der unterschiedlichen eingesetzten Substanzen zur Modulation des „oxidative burst“ am PMN-System | 57 |

Susanne Szalay

Liebigstraße 35

35392 Gießen

Tel.: 0641/72620

Lebenslauf:

Persönliche Daten :

Geburtsdaten: geboren am 13. Juni 1968 in Bad Nauheim als erstes von zwei Kindern

Eltern: Christa Holbe (Bankangestellte), geb. Kipp, und Josef Holbe (Lehrer)

Geschwister: Marianne Holbe (Krankenschwester)

Familienstand: seit 15. November 1991 verheiratet mit Zoltán Szalay
am 08. April 1992 Geburt unserer Tochter Lisa Mary
am 04. April 1994 Geburt unseres Sohnes Valentin Felix

Konfession: röm.-katholisch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildungs- und beruflicher Werdegang:

- 08/74-07/78 Grundschule Friedberg/Ockstadt
- 08/78-07/87 St.-Lioba-Schule, Bischöfliches Gymnasium in Bad Nauheim,
Schulabschluß mit dem Abitur (Leistungsfächer Kunst und
Biologie)
- 10/87-09/88 einjährige Ausbildung als Krankenpflegehelferin an der
William-Harvey-Klinik in Bad Nauheim (Prof. Dr. Med. W.
Hach)
- 09/88-06/90 vier Semester Vorklinik an der *Semmelweis-Universität* in
Budapest/Ungarn, Abschluß mit der Ärztlichen Vorprüfung
- 10/90-08/93 klinischer Abschnitt (6 Semester) an der *Justus-Liebig-Universität* in Gießen bis zum Zweiten Staatsexamen

Teilnahme am Kongreß der *Deutschen Gesellschaft für Herz
und Kreislaufforschung* in Mannheim im April 1993

Teilnahme am Kongreß der *American Heart Association* in
Atlanta/USA im November 1993
- 10/93-09/94 Praktisches Jahr an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
mit Wahlfach Psychiatrie.

Abschluß des Medizinstudiums am 14. November 1994 mit
dem 3. Staatsexamen

| | |
|-------------|---|
| 09/95-07/97 | AIP in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin der Justus - Liebig Universität, in der Schmerztherapie. |
| 08/97-09/98 | Innere Medizin als Stationsärztin im Krankenhaus am Balserschen Stift, der Gemeinschaftspraxis, Dres Pfaff, Weppner, Büdinger, Gießen |
| seit 10/98 | Praxisassistentin: Allgemeinmedizin, in der Gemeinschaftspraxis Dres. Karg, Fachärzte für Allgemeinmedizin, Gießen |

Susanne Szalay

